

Alessandra Cadete Martini

Lipoxina A4 na dor neuropática após a lesão medular: modulação da
neuroinflamação e ativação microglial

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Giles Alexander Rae

Coorientador: Dr. Allisson Freire Bento

Florianópolis - SC
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Martini, Alessandra Cadete

Lipoxina A4 na dor neuropática após a lesão medular:
Modulação da neuroinflamação e ativação microglial /
Alessandra Cadete Martini ; orientador, Giles Alexander
Rae ; coorientador, Allisson Freire Bento. - Florianópolis,
SC, 2015.

135 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. lesão medular. 3. dor neuropática.
4. lipoxina A4. I. Rae, Giles Alexander . II. Freire
Bento, Allisson. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV.
Título.

“Lipoxina A4 na dor neuropática após a lesão medular: modulação da neuroinflamação e ativação microglial”

Por

Alessandra Cadete Martini


Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (011/FMC/UFSC) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia – UFSC, composta pelos doutores:

Orientador:



Dr(a) Giles Alexander Rae (FMC/CCB/UFSC)

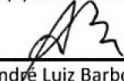
Banca examinadora:



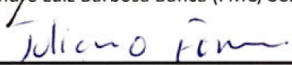
Dr(a) Fabrício Alano Pamplona (Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino)



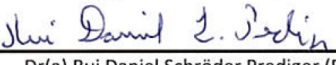
Dr(a) Waldiceu Verri Junior (CCB/UJEL)



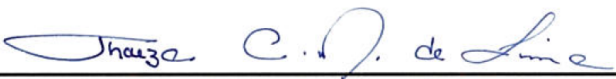
Dr(a) André Luiz Barbosa Báfica (FMC/CCB/UFSC)



Dr(a) Juliano Ferreira (FMC/CCB/UFSC)



Dr(a) Rui Daniel Schröder Prediger (FMC/CCB/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro de Lima
Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Farmacologia

Florianópolis, 13 de março de 2015.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luiz Carlos e Odete, pelo apoio incondicional e indispensável para que eu pudesse trilhar os meus caminhos. Que sorriram e choraram comigo, acreditando nas minhas escolhas. Muito obrigada.

Ao meu irmão, Alexandre, que está sempre do meu lado, me apoiando e fazendo rir, e à minha cunhada Alessandra e meus sobrinhos Lucas e Gustavo. Seria bem mais difícil se eu não pudesse contar com vocês.

À Stefânia Forner, com quem divido os experimentos e a vida. Por tornar meus dias mais leves e bonitos, me fazer enxergar além dos problemas, querendo melhorar e crescer sempre. Por ser a certeza entre tantas coisas incertas. Palavras jamais serão suficientes para agradecer todo o companheirismo, amizade e amor.

Ao professor Giles, pelo conhecimento compartilhado nesses anos e por ter permitido a realização desse estudo, e ao Dr. Allisson Bento pelas valiosas sugestões e discussões sobre o trabalho.

Ao professor Ru-Rong Ji, que me aceitou em seu laboratório na Universidade Duke, me dando liberdade total para trabalhar, discutir e partilhar conhecimento com alguns dos melhores. À toda sua equipe e em especial aos Drs. Gang Chen e Yong-Ho e ao Alexander Chamesian.

Ao Dr. Temugin Berta, cuja ajuda foi essencial para a realização desse trabalho, discutindo todos os resultados com muita paciência, piadas e chocolates. Obrigada pela amizade e por ter acreditado em mim.

À Nanica, o melhor cão do mundo e minha fiel companheira.

Às colegas e amigas de laboratório, Lenyta Gomes, Samilla Schroeder, Ana Paula Luiz e Giselle Guginski, e à colega “adotada” Lara C. Assis, pelas agradáveis horas de trabalho, conversas, desabafos e risos. Certamente sentirei saudades.

Aos meus amigos, Alini, Bruna, Caro, Didi, Elza, Janaína e Samuel, simplesmente pelo fato de serem os melhores, presentes nas reclamações e vitórias, e representarem tudo aquilo que uma verdadeira amizade quer dizer.

Aos queridos amigos que o Departamento me trouxe, Ronald Paiva, Juliana Fabris e Claudia Figueiredo, pela amizade, risos, conversas e apoio em todos os momentos.

Às queridas Mariana Maioral e Naiandra Dittrich, pela amizade sincera e pelo apoio indispensável durante os meses de sanduíche. Vocês são ótimas!

Aos amigos de Chapel Hill e Durham, os quais espero levar pela vida, Samantha, Chris, David, Kathleen, Rodrigo e Francesca, que tornaram meu período nos EUA inesquecível.

À Julianna Gomes, que com tantas piadas e alongamentos manteve minha sanidade física e mental durante esses anos.

Aos demais professores do Departamento de Farmacologia, por contribuírem com uma parte substancial da minha formação, e em especial ao professor Reinaldo Takahashi que, sem saber, deu ótimos exemplos, além das produtivas conversas sobre assuntos aleatórios.

À Professora Soraia D. Schoeller, do Departamento de Enfermagem da UFSC, pela contribuição à minha formação profissional durante esses anos em que dividimos a coordenação grupo (Re)Habilitar. E aos acadêmicos e profissionais que por lá passaram, também dividindo conhecimentos.

À Dra. Janice Koepp, responsável pela minha entrada no mundo científico, acreditando que eu seria capaz de fazer esse e outros trabalhos.

À Dra. Juliana Chaves, à Marianne Manjavachi e à Dra. Verônica Horewicz pelo auxílio na realização de alguns experimentos deste estudo.

À todos os funcionários do Departamento, em especial à Sheila e ao Pedro, e aos funcionários do biotério central, pela cordialidade e auxílio durante esses anos.

Ao apoio financeiro do CNPq, CAPES, FAPESC e NIH.

"Todas as vitórias ocultam uma abdicação"
Simone de Beauvoir

RESUMO

A dor crônica está presente na maioria dos pacientes após a lesão medular traumática (LMT). As respostas inflamatórias após a lesão medular estão relacionadas com o desenvolvimento da dor neuropática através da ativação de um vasto número de mediadores e vias de sinalização. A lipoxina A4 (LXA4), um eicosanoide com propriedades anti-inflamatórias e pró-resolução, exerce ações neuroprotetoras e anti-hiperalgésicas. Entretanto, seu papel na dor neuropática induzida pela lesão medular ainda não foi elucidado. Sob completa anestesia, ratos Wistar e camundongos CD1 machos receberam uma hemisseção medular na porção esquerda do segmento T10. Em 4 e 24 horas após a lesão, os animais foram tratados por via intratecal com LXA4 (150 ou 300 pmol) ou veículo. Em outro protocolo, foi realizado o silenciamento gênico do receptor de lipoxina A4, ALX/FPR2, através do tratamento por via intratecal com ALX/FPR2 RNAsi. A sensibilidade mecânica das patas posteriores foi avaliada após a lesão medular através da frequência de resposta ao filamento de von Frey de 15 g em ratos e por uma sequência de filamentos (método up-down) em camundongos. No 7º dia após a cirurgia, a medula espinhal foi coletada e processada para análise do teor endógeno de LXA4 e também dos níveis de expressão do receptor ALX/FPR2, marcadores gliais e citocinas, por RT-PCR. Culturas de microglia também foram preparadas a partir do córtex cerebral de camundongos para avaliação dos efeitos diretos da LXA4 na expressão de citocinas e ativação de proteínas quinases (MAPK) nestas células. Todos os procedimentos foram aprovados pelos comitês de ética locais. Os animais falso-operados apresentaram sensibilidade mecânica

normal após a cirurgia. Houve aumento da resposta ao estímulo de von Frey em ambas as patas posteriores de ratos a partir do dia 7 e até o dia 28 após a cirurgia. Os camundongos apresentaram aumento de sensibilidade da pata posterior ipsilateral a partir do 14º dia e da pata contralateral a partir do 7º dia, a qual durou pelos 35 dias de observação. Houve aumento da expressão do RNAm do receptor ALX/FPR2 no 7º dia após a lesão em ambas as espécies. O tratamento intratecal com LXA4 reduziu a hiperalgesia mecânica, em comparação ao grupo tratado com veículo, em ratos e camundongos, mas o silenciamento gênico do receptor em camundongos bloqueou este efeito. A LXA4 também reduziu os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α , e aumentou o nível da citocina anti-inflamatória IL-10, na medula espinhal de ratos. Finalmente, a LXA4 reduziu a ativação de p38 e a liberação de TNF- α induzidas por IFN- γ em culturas de microglia. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a LXA4 pode reduzir efetivamente a dor neuropática após a lesão medular em roedores, pela inibição da neuroinflamação e das respostas da microglia na medula espinhal. Assim, a LXA4 e seus análogos poderiam ser utilizados para prevenção da dor neuropática e da neuroinflamação induzidas pela lesão medular.

Palavras-chave: lesão medular; dor neuropática; neuroinflamação; lipoxina A4; receptor ALX/FPR2; microglia.

ABSTRACT

It is well known that after traumatic spinal cord injury (SCI) majority of patients develop chronic pain syndromes. Spinal inflammatory responses to SCI have been implicated in the onset of neuropathic pain via activation of a broad spectrum of factors and signaling pathways. Lipoxin A4 (LXA4), an eicosanoid endowed with anti-inflammatory and pro-resolution properties, exerts neuroprotective and antihyperalgesic effects. However, its role in SCI-induced neuropathic pain still remains to be elucidated. Spinal cord hemisection at the left side of T10 was carried out in anesthetized adult male Wistar rats and CD1 mice. At 4 and 24 h after SCI, the animals received two intrathecal LXA4 (150 pmol or 300 pmol) or vehicle injections. In a different protocol, animals also received an intrathecal treatment of ALX/FPR2 siRNA for receptor gene silencing. Mechanical sensitivity of hind paws was evaluated after SCI using a 15g von Frey hair in rats or with a series of von Frey hairs in mice (up-down method). On the 7th day after surgery the spinal cord was collected and processed to evaluate the levels of endogenous LXA4 as well as the transcriptional expression level by RT-PCR of the ALX/FPR2 receptor, cytokines and glial markers. Microglia cultures were also prepared from mice cerebral cortexes to assess the direct effects of LXA4 on microglial cytokine expression and MAPK activation. The local ethics committees approved all procedures. Sham-operated animals showed normal mechanical responsiveness after the surgery. The mechanical responsiveness to von Frey hair was increased on both rat hind paws from day 7 until day 28 after SCI. Mice started presenting increased sensitivity on the ipsilateral paw on day 14 and in

the contralateral paw on day 7, until the 35th days of observation. The ALX/FPR2 receptor mRNA was significantly increased in both species on the 7th day after SCI. Intrathecal treatment of LXA4 reduced SCI-induced mechanical hypersensitivity when compared to vehicle control group in both rats and mice, but the gene silencing with the respective siRNA in mice for the receptor blocked this effect. The LXA4 treatment also reduced the levels of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α and increased the levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10, on rat spinal cord. Finally, LXA4 reduced the IFN- γ -induced p38 activation and TNF- α release in microglia cultures. Taken together, our results suggest that LXA4 can effectively reduce neuropathic pain in rodents after SCI, by inhibiting SCI-induced neuroinflammation in the spinal cord and microglial responses. Thus, LXA4 and its analogs may be used to prevent SCI-induced neuropathic pain and neuroinflammation.

Keywords: spinal cord injury; neuropathic pain; neuroinflammation; lipoxin A4; ALX/FPR2 receptor; microglia.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

acCOX-2 - Ciclooxygenase-2 acetilada
ANOVA – Análise de variância
ALX/FPR2 – Receptor de lipoxina
ATL – Lipoxina gerada pela aspirina
BBB – Basso, Beattie e Bresnahan
cAMP – Monofosfato cíclico de adenosina
cDNA – DNA complementar
CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais
CGRP - Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX - Ciclooxygenase
CYP - Citocromo P450
DAB - 3,3',4,4' -tetraaminobefeniltetrahydroclorídrico
DHA – Ácido docosahexanóico
DMEM - Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco
DNA - Ácido desoxirribonucléico
dNTPs - Deoxinucleotídeos
DTT - Ditionitrito
E.P.M. – Erro padrão da média
EPA – Ácido eicosapentaenóico
ERK1/2 – Proteína quinase regulada por sinal extracelular
GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GFAP - Proteína glial fibrilar ácida
GPCR – Receptor acoplado à proteína G
GRD – Gânglio da raiz dorsal
HETE - Ácido eicosatetraenóico
Iba – 1 - Molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado 1
IFN γ – Interferon gama
IL – Interleucina
i.t. - Intratecal
JNK – Proteína quinase c-Jun-NH2- terminal
LOX - Lipoxigenase
LTs - Leucotrienos
LXA4 – Lipoxina A4
LXB4 – Lipoxina B4
MAPKs – Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MAG - Glicoproteína associada à mielina

MaRs - Maresinas
MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos-1
Omgp - Glicoproteína da mielina de oligodendrócitos
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PBS – Salina tamponada com fosfato
PDs - Protectinas
PMN - Polimorfonuclear
PUFAs – Ácidos graxos poliinsaturados
RNA – Ácido ribonucleico
RNAm – RNA mensageiro
RNasin - Inibidor de RNase
RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RvEs - Resolvinas série E
RvD - Resolvinas série D
SNC – Sistema nervoso central
TRM – Traumatismo raquimedular
TNF – Fator de necrose tumoral
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais alterações na fisiopatologia da lesão medular traumática.....	31
Figura 2. Neuroinflamação e desenvolvimento da dor crônica.....	39
Figura 3. Vias de formação dos mediadores lipídicos pró-resolução.....	46
Figura 4. Esquema de tratamento e avaliação comportamental por filamentos de von Frey realizado em camundongos CD1.....	64
Figura 5. Esquema de tratamento realizado em camundongos CD1 para silenciamento gênico do receptor ALX/FPR2 e avaliação dos efeitos da LXA4.....	65
Figura 6. Avaliação da escala BBB de atividade locomotora em animais submetidos à hemissecção da medula espinhal.....	78
Figura 7. Avaliação dos efeitos da hemissecção medular em T ₁₀ sobre a sensibilidade mecânica frente ao estímulo das patas anteriores com filamentos de Von Frey.....	79
Figura 8. Avaliação dos efeitos da hemissecção medular em T ₁₀ sobre a sensibilidade mecânica frente ao estímulo das patas posteriores com filamentos de Von Frey.....	81
Figura 9. Dosagem de LXA4 na medula espinhal de animais submetidos ou não à lesão medular.....	82
Figura 10. Efeito da lesão medular sobre os níveis de RNAm para o receptor ALX/FPR2 na medula espinhal e gânglio da raiz dorsal.....	83
Figura 11. Efeito do tratamento com lipoxina A4 sobre a hiperalgesia mecânica das patas posteriores induzida por lesão medular.....	85
Figura 12. Avaliação do efeito do tratamento com LXA4 sobre a atividade locomotora de animais submetidos à hemissecção medular.....	86
Figura 13. Efeito da lesão medular e do tratamento com lipoxina A4 nos níveis de IL-1 β , IL-6, TNF α e IL-10.....	88
Figura 14. Efeito do tratamento com lipoxina A4 sobre a hiperalgesia mecânica das patas posteriores induzida por lesão medular.....	90

Figura 15. Efeito do silenciamento do receptor ALX/FPR2 na ação da lipoxina A4.....	91
Figura 16. Análise comparativa da expressão de marcadores celulares entre os segmentos lombar e torácico da medula espinhal.....	92
Figura 17. Efeito da LXA4 sobre a expressão do RNAm de marcadores neuroinflamatórios na medula espinhal.....	93
Figura 18. Expressão dos marcadores celulares Iba-1 e GFAP na medula espinhal no sétimo dia após o trauma medular.....	94
Figura 19. Expressão dos marcadores celulares Iba-1 e GFAP na medula espinhal no 35º dia após o trauma medular.....	96
Figura 20. Redução da liberação de TNF- α de culturas de células da microglia do córtex cerebral após tratamento com LXA4.....	97
Figura 21. Redução da ativação da proteína p38 MAPK em cultura de células da microglia de córtex cerebral após tratamento com LXA4.....	98
Figura 22. Efeito do tratamento de culturas de astrócitos com LXA4 na liberação de MCP-1.....	99
Figura 23. Expressão do receptor ALX/FPR2 e do mRNA em culturas de microglia, astrócitos e medula espinhal.....	100
Figura 24. Representação esquemática da formação da lipoxina A4 e dos efeitos produzidos pela sua administração após a lesão medular.....	117

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1. Lesão medular traumática	23
1.2 Fisiopatologia da lesão medular	25
1.3 Modelos animais.....	31
1.4 Tratamento atual	33
1.5 Dor neuropática – uma resposta mal-adaptada.....	34
1.6 Dor após a lesão medular.....	40
1.7 Resolução da inflamação	43
1.8 Lipoxinas.....	46
1.9. Lipoxinas e a dor	49
2. OBJETIVOS.....	53
2.1. Objetivo geral.....	53
2.2. Objetivos específicos	53
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	55
3.1 Animais.....	55
3.2. Metodologias empregadas para ratos	55
3.2.1 Modelo experimental de hemissecção da medula espinal	55
3.2.2. Avaliação da Atividade Locomotora	57
3.2.3 Avaliação da alteração nociceptiva mecânica.....	57
3.2.4. Efeito da administração de lipoxina A4 na hiperalgesia mecânica induzida por lesão medular	58
3.2.5. Extração do RNA total	59
3.2.6. Ensaio de transcrição reversa seguida de reação em cadeia de polimerase em tempo real (PCR em tempo real).....	59
3.2.7. Análise dos níveis de mediadores inflamatórios.....	61
3.2.8. Dosagem de LXA4 na medula espinal	61
3.3. Metodologias empregadas para camundongos.....	62
3.3.1.Modelo experimental de hemissecção da medula espinal em camundongos	62
3.3.2. Avaliação das alterações na nocicepção mecânica	63
3.3.3. Administração intratecal de lipoxina A4.....	64
3.3.4. Silenciamento gênico do receptor ALX/FPR2	65
3.3.5. Extração do RNA total	66

3.3.6. Ensaio de transcrição reversa seguido de reação em cadeia de polimerase em tempo real (PCR em tempo real)	66
3.3.7. Eletroforese em gel de agarose.....	67
3.3.8. Imunoistoquímica	68
3.3.9. Experimentos com cultura primária de microglia.....	69
3.3.10. Experimentos com cultura primária de astrócitos	72
3.3.11. Drogas, reagentes e soluções	73
3.3.12. Análise de resultados.....	75
4. RESULTADOS.....	77
4.1. Resultados obtidos com experimentos realizados em ratos	77
4.1.1. Avaliação da atividade locomotora após a lesão medular	77
4.1.2. Alteração da sensibilidade mecânica em decorrência da lesão medular.....	78
4.1.3. Avaliação do teor de lipoxina A4 na medula espinhal...82	
4.1.4. Análise dos níveis de RNAm para o receptor ALX/FPR2 após a lesão medular	83
4.1.5. Efeito da administração intratecal de lipoxina A4 sobre a sensibilidade das patas posteriores frente ao estímulo mecânico após a lesão medular	84
4.1.6. Efeito da administração intratecal de lipoxina A4 sobre a atividade locomotora após a lesão medular.....	85
4.1.7. Avaliação da liberação de citocinas após a lesão medular e o tratamento com LXA4.....	87
4.2 Resultados obtidos com experimentos realizados em camundongos	89
4.2.1. Avaliação da sensibilidade mecânica induzida pela lesão medular após o tratamento com lipoxina A4	89
4.2.2. Ação da lipoxina A4 na dor neuropática através do receptor ALX/FPR2	90
4.2.3. Análise dos níveis de RNAm para diferentes marcadores neuroinflamatórios na medula espinhal após a lesão medular	91
4.2.4. Lipoxina A4 reduz ativação celular na medula espinhal após a lesão medular	93
4.2.5. Ações da LXA em cultura de microglia.....	97
4.2.6. Ações da LXA4 em cultura de astrócitos	98

4.2.7. Expressão do receptor ALX/FPR2 em células da microglia.....	99
5. DISCUSSÃO.....	101
6. CONCLUSÕES.....	119
7. REFERÊNCIAS.....	121
8. ANEXOS.....	139

1. INTRODUÇÃO

1.1. Lesão medular traumática

A lesão medular traumática (LMT) é uma condição médica complexa e altamente incapacitante. Historicamente, sempre esteve associada com altas taxas de mortalidade. Entretanto, atualmente, em países com rendimento elevado, a lesão medular passou a ser vista muito mais como um desafio social e pessoal que pode ser superado com sucesso do que o fim de uma vida produtiva e válida. Essa mudança reflete diretamente melhores condições médicas, o que significa que as pessoas podem usufruir serviços de emergência aprimorados, intervenções de saúde e reabilitação eficazes, além de mais serviços sociais e ambientes acessíveis, permitindo-as sobreviver mesmo após a lesão. Por outro lado, a situação é muito diferente em países menos desenvolvidos. Nesses casos, a disponibilidade limitada de serviços médicos e de reabilitação, além da baixa inclusão social, fazem com que a lesão medular seja considerada, com frequência, uma condição terminal.

Globalmente, a incidência de lesão medular é de 40 a 80 novos casos por milhão/ano - o que significa dizer que, todos os anos, entre 250 e 500 mil pessoas sofrem lesão medular (World Health Organization. e International Spinal Cord Society., 2013). No Brasil os dados epidemiológicos são escassos, sendo que o dado mais recente relata 250 mil pessoas vivendo com lesão medular em nosso país, aos quais se somam 9 mil novos casos por ano (Meyer *et al.*, 2003). De acordo com Lee e colaboradores (2013), a LMT afeta, principalmente, homens na faixa etária de 18 a 32 anos em países em desenvolvimento,

enquanto nos países desenvolvidos, por conta da maior longevidade, a lesão ocorre, majoritariamente, em homens e mulheres acima dos 65 anos (Lee *et al.*, 2014). Segundo a NSCISC (National Spinal Cord Injury Statistical Center), em todo o mundo, os acidentes automobilísticos e as quedas lideram as causas de lesão medular, seguido de eventos violentos e traumatismos esportivos (Nscisc, 2013; Lee *et al.*, 2014).

Aproximadamente 55% das lesões medulares ocorrem na região cervical. A mobilidade aumentada na região cervical somada às vértebras menores e com força reduzida de estabilização tornam esta região mais propensa a lesões. Há uma variação entre a localização anatômica incidente e frequência da lesão medular. Enquanto 52% de todos os casos diagnosticados ocorram na região cervical, apenas 40% dos casos prevalentes apresentam lesões nesta região, indicando a alta mortalidade associada ao trauma medular cervical (Sekhon e Fehlings, 2001).

Os sintomas de uma lesão na medula dependem da extensão da lesão, mas podem incluir perda ou redução do controle motor ou sensorial das extremidades e/ou do tronco, bem como a redução ou perda na regulação autonômica do corpo. Dessa forma, respiração, batimentos cardíacos, pressão sanguínea, temperatura corpórea, controle da bexiga e intestinos, além das funções sexuais, também são afetados. Em geral, quanto mais alta na coluna vertebral ocorrer a lesão, maiores e mais severos serão os danos. A lesão cervical leva à perda do controle motor e sensorial nos braços, tronco e perna, uma condição chamada de tetraplegia. Normalmente, estes pacientes necessitam aparelhos de ventilação para respirar uma vez que a lesão interfere diretamente no

controle autonômico. Lesões torácicas geralmente causam perda sensorial e/ou motora no tronco e nas pernas, condição chamada de paraplegia, enquanto lesões lombares causam perda motora e sensorial nos quadris e pernas. A extensão e severidade da perda sensorial, motora e autonômica depende não apenas do nível em que a lesão ocorre, mas também se a lesão é “completa” ou “incompleta”. De acordo com a escala da Associação Americana de Lesão Medular (*American Spinal Injury Association* – ASIA), uma lesão pode ser considerada completa quando não há função motora e sensorial nos segmentos vertebrais sacrais S4 – S5 (Berkovsky, 2010).

Ainda, cerca de 40-50% das pessoas apresentam dor neuropática nos primeiros doze meses após a lesão medular, condição que ainda não possui tratamento eficaz. A prevalência é em torno de 69%, sendo que em um terço desses pacientes a dor é caracterizada como severa (Siddall e Finnerup, 2006; Siddall, 2009). Dessa maneira, um dos objetivos do presente trabalho é investigar o desenvolvimento e a modulação da dor neuropática após a lesão medular.

A incidência marcada e os custos elevados implicados no diagnóstico, tratamento e reabilitação destes pacientes fazem com que a lesão medular represente um grande problema socioeconômico. A compreensão dos mecanismos envolvidos nesse quadro é importante não apenas para a melhora do aspecto locomotor dos indivíduos com lesão medular como das comorbidades que os acompanham.

1.2 Fisiopatologia da lesão medular

Para que haja o desenvolvimento de terapias efetivas para o tratamento da lesão medular, é fundamental a compreensão detalhada

dos mecanismos fisiopatológicos que ocorrem após o trauma e da forma através da qual estes vários componentes interagem entre si para resultar nos déficits funcionais observados. Dessa forma, a fisiopatologia da lesão medular é descrita em duas fases: a lesão primária e a lesão secundária.

A lesão mecânica primária pode ser classificada em quatro mecanismos característicos, sendo mais comum o impacto somado à compressão persistente da medula. Este tipo de lesão ocorre em fraturas por deslocamento ou ruptura aguda do disco medular, quando fragmentos de osso comprimem a medula. O segundo mecanismo ocorre por impacto com compressão transitória, como em pacientes que apresentam alguma patologia cervical preexistente. A lesão por hiperextensão, decorrente do alongamento forçado da coluna, ocorre por cisalhamento ou estiramento da medula espinhal e/ou do seu suprimento sanguíneo. Por fim, a laceração ou transecção da medula podem ocorrer por deslocamento severo ou feridas penetrantes, levando à secção parcial ou total da medula (Dumont *et al.*, 2001; Rowland *et al.*, 2008).

A lesão primária desencadeia uma série de processos fisiopatológicos na medula espinhal que levam à fase secundária da lesão, que pode persistir por anos. Estes processos dificultam a sobrevivência neuronal, tornam o ambiente inóspito para a regeneração, levando ao prejuízo da recuperação funcional (McDonald e Sadowsky, 2002; Dasari *et al.*, 2014). O evento imediato resultante da lesão primária é a ruptura mecânica do tecido, levando a uma zona hemorrágica de necrose localizada, predominantemente, na substância cinzenta, devido à abundante vascularização desta região (Profyris *et al.*, 2004). A lesão endógena secundária inicia-se em seguida, sendo

caracterizada por diversas alterações persistentes que serão discutidas a seguir (Dumont *et al.*, 2001; Profyris *et al.*, 2004; Fleming *et al.*, 2006; Donnelly e Popovich, 2008; Rowland *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2014). Estas alterações iniciam-se com o surgimento de pontos hemorrágicos, resultantes da perda da integridade estrutural dos capilares sanguíneos, em regiões distantes do sítio de lesão original. Uma vez que a hemoglobina liberada é tóxica às células do sistema nervoso central (SNC), este fenômeno faz com que o volume de tecido neural destruído se expanda (Regan e Guo, 1998; Gerzanich *et al.*, 2009). Embora ainda não sejam completamente evidentes as alterações histopatológicas, outros processos fisiopatológicos já iniciaram e estão ocorrendo nesse momento. A ativação de células da microglia inicia-se quase que instantaneamente, com o aumento da produção e liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α , detectáveis dentro de minutos após a lesão (Pineau e Lacroix, 2007; Donnelly e Popovich, 2008). Ainda, o trauma medular resulta na liberação excessiva de glutamato que, especialmente no ambiente hipóxico da medula lesionada, leva ao estímulo exagerado dos receptores glutamatérgicos resultando na morte celular por neuroexcitotoxicidade (Profyris *et al.*, 2004; Carlson *et al.*, 2010).

A fase aguda, cuja duração é de 2 horas a 2 semanas após a lesão, é o período no qual os processos da lesão secundária tornam-se dominantes. Por razões práticas, é o período mais passível de intervenções neuroprotetoras, uma vez que compreende o momento em que tipicamente os pacientes são recebidos para atendimento. Alguns dos principais eventos descritos nessa fase, e considerados potenciais alvos terapêuticos, serão descritos a seguir. A perda da homeostase

iônica, por exemplo, está diretamente relacionada com a morte celular por apoptose e necrose. O desequilíbrio nas concentrações de cálcio exacerba a morte celular, além de levar à disfunção mitocondrial e a produção de radicais livres (Schanne *et al.*, 1979; Stys, 1998; Dumont *et al.*, 2001). A formação de radicais livres e peroxidação lipídica causa morte oxidativa dos neurônios da medula espinhal e diminui o fluxo sanguíneo da medula, exacerbando o edema e a inflamação (Sakamoto *et al.*, 1991; Toborek *et al.*, 1999; Dumont *et al.*, 2001).

Enquanto o aumento inicial da permeabilidade é decorrente das perturbações às células endoteliais e processos astrocíticos, um número elevado de mediadores inflamatórios, tais como IL-1 β e TNF- α , possuem efeitos intensos na permeabilidade vascular (Tator e Fehlings, 1991; Schnell *et al.*, 1999; Donnelly e Popovich, 2008). A apoptose é outra alteração presente na lesão secundária e ocorre em populações de neurônios, oligodendrócitos, microglia e astrócitos. A morte de oligodendrócitos na substância branca persiste por várias semanas após a lesão, podendo contribuir para a desmielinização (Crowe *et al.*, 1997; Hausmann, 2003; Fleming *et al.*, 2006). Ainda, há a ativação das respostas imunes inata e adaptativa, que envolvem rápida produção de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, IL-1 β e IL-6. Entretanto, a inflamação excessiva e continuada pode gerar alterações prejudiciais ao organismo. As células gliais residentes passam a um estado de ativação, caracterizado por alterações morfológicas e aumento na liberação de mediadores álgicos. A expressão aumentada de moléculas de adesão endoteliais, juntamente com outras citocinas e quimiocinas, aumenta a transmigração celular ao tecido medular e a ativação de neutrófilos, os quais aderem às vênulas pós-capilares e migram para o

sítio da lesão para realizar a fagocitose dos restos celulares. Após a entrada dos neutrófilos, mediadores pró-inflamatórios os induzem a produzirem suas próprias citocinas, que estimulam a quimiotaxia dos leucócitos e aumentam o dano neuronal (Profyris *et al.*, 2004; Fleming *et al.*, 2006; Popovich e Longbrake, 2008). A perda do balanço entre as citocinas pró- e anti-inflamatórias na região do corno dorsal contribui de maneira significativa para a cronicidade da dor nestas condições (Allan e Rothwell, 2001; Clark *et al.*, 2013).

As últimas fases da lesão endógena secundária, que podem durar de meses a anos, são caracterizadas pelo desenvolvimento de cistos e a formação de uma cicatriz astrogliar. Uma alteração bem evidente é a degeneração Walleriana, que representa a desintegração anterógrada dos axônios que foram seccionados após a lesão. Ela é caracterizada por bainhas de mielina fragmentadas e distorcidas, com alterações no axoplasma (Norenberg *et al.*, 2004). As respostas astrocíticas têm sido estudadas em diversos modelos experimentais, e os termos “gliose” e “astrogliose” são frequentemente usados para descrever a hipertrofia celular dos astrócitos e o aumento na produção de filamentos intermediários, caracterizando estas células como “astrócitos reativos”. Aparentemente, a cicatrização glial é um fator crucial relacionado a regeneração de lesões no SNC, uma vez que a eliminação do contingente de astrócitos reativos leva ao aumento do tamanho da lesão e a uma perda exagerada de macromoléculas através da barreira hematoencefálica que se encontra comprometida (Faulkner *et al.*, 2004; Myer *et al.*, 2006). A natureza molecular da cicatriz glial, incluindo a produção de moléculas inibitórias pelos astrócitos, é a principal causa de falha na regeneração axonal (Fitch e Silver, 2008). As teorias que

propõem a contribuição dos astrócitos à ausência de regeneração no SNC baseiam-se em três pontos principais: 1) falha em proporcionar um substrato celular apropriado para o crescimento axonal; 2) ausência de fatores apropriados que regulem e direcionem o crescimento axonal; 3) a produção de moléculas que inibem o alongamento axonal, como os proteoglicanos (Jones, Margolis, *et al.*, 2003; Jones, Sajed, *et al.*, 2003). Além dos astrócitos, a mielina do SNC também produz substâncias capazes de inibir o crescimento de axônios. Estes componentes são a glicoproteína associada à mielina (MAG, *myelin-associated glycoprotein*), a Nogo-A e a glicoproteína da mielina de oligodendrócitos (Omgp, *oligodendrocyte-myelin glycoprotein*). Estas três proteínas estão predominantemente localizadas na porção interna da lamela da bainha de mielina, fazendo contato direto com os axônios (Wang *et al.*, 2002; Schweigreiter e Bandtlow, 2006; Fitch e Silver, 2008; Ohtake e Li, 2014). A figura 1 demonstra os principais eventos fisiopatológicos ocorridos após o trauma medular.

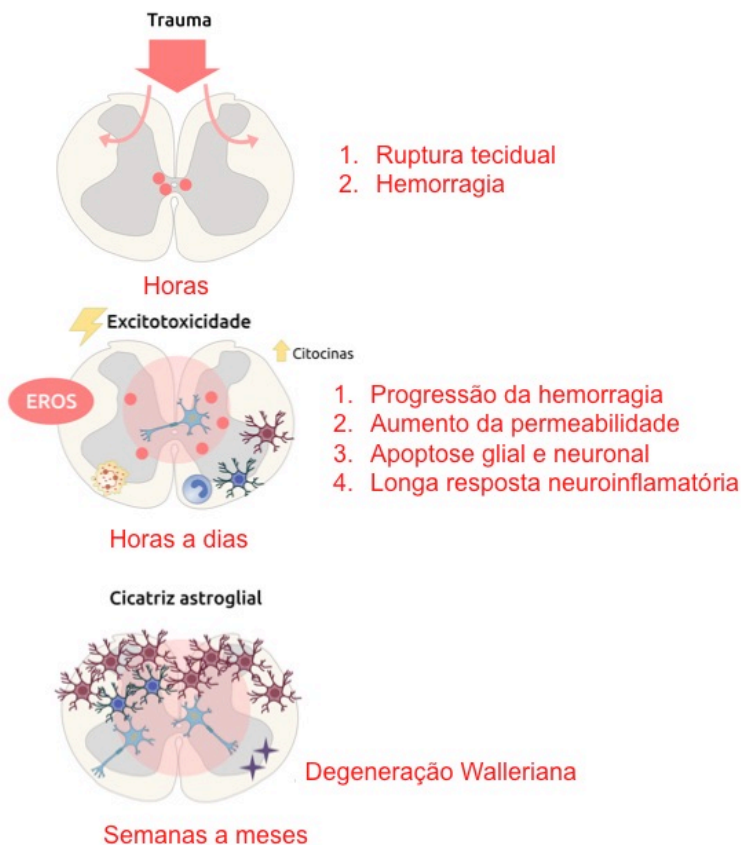


Figura 1. Principais alterações na fisiopatologia da lesão medular traumática.

1.3 Modelos animais

A utilização de modelos experimentais em animais ainda é fundamental para maior compreensão da fisiopatologia da lesão medular e o desenvolvimento de novas terapias. Em 1978, Rivlin e Tator desenvolveram a técnica de compressão por clipe vascular visando

simular o deslocamento e pressão contínua da medula que ocorrem frequentemente após as lesões medulares (Rivlin e Tator, 1978). Em 1987, o primeiro aparelho de impacto capaz de produzir lesão medular traumática foi apresentado por Bresnahan e colaboradores, porém na época eram observados alguns problemas em relação a reprodutibilidade do método (Bresnahan *et al.*, 1987). Atualmente, quatro impactores são amplamente aceitos como método padrão para a indução de lesões por contusão em roedores: o *Ohio State University (OSU) impactor*; o *Infinite Horizons impactor*; o *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study (MASCIS) Impactor* e o *NYU Weight-Drop Device* (O'Brien, 2006). A contusão pode ser total ou parcial, sendo que a parcial é caracterizada por impacto em apenas um dos lados da medula, preservando-se o lado oposto. Outro modelo, padronizado por Vanický e colaboradores (2001), é capaz de induzir a compressão da medula espinhal por meio da inserção de um cateter de embolectomia no espaço epidural dorsal, sendo que o dano medular pode ser ajustado de acordo com o volume de salina utilizado para inflar o balão do cateter e o tempo de manutenção da compressão (Vanický *et al.*, 2001).

Os modelos de transecção medular são usados para simular lacerações da medula espinhal e são feitos, geralmente, utilizando tesouras cirúrgicas. Nos modelos de hemissecção, como o utilizado no presente trabalho, apenas alguns tratos espinhais são atingidos. Dependendo da severidade da lesão, o dano neurológico resultante pode ser relativamente brando, tornando os cuidados pós-operatórios mais fáceis, principalmente no que diz respeito à função urinária. Estes modelos também permitem comparar a resposta de regeneração de um trato em particular com o lado contralateral preservado (Kwon *et al.*,

2002). Ainda, em uma lesão parcial, tanto a dor espontânea quanto a dor evocada por estímulo podem ser causadas pelos circuitos remanescentes na medula espinhal nas porções cranial, caudal e/ou através da porção intacta adjacente ao local da lesão (Christensen *et al.*, 1996; Christensen e Hulsebosch, 1997). Estes e outros modelos em animais permitem uma análise profunda das mudanças moleculares e bioquímicas que ocorrem em resposta à lesão de uma maneira que não seria possível ou eticamente aceita em estudos com humanos.

1.4 Tratamento atual

Após o trauma medular inicial, a perda de tecido e a morte celular continuam ocorrendo durante semanas, criando uma janela de tempo para intervenção com estratégias neuroprotetoras. A intervenção clínica atual se restringe, essencialmente, na estabilização da coluna vertebral, restauração do alinhamento, descompressão da medula espinhal e no uso de doses elevadas de fármacos anti-inflamatórios (Thuret *et al.*, 2006; Berkovsky, 2010; Ramer *et al.*, 2014). Conforme o conhecimento acerca dos complexos eventos da lesão secundária cresce, estas intervenções continuam a ser seguidas e aprimoradas. A associação entre inflamação e a lesão secundária levaram ao uso de corticosteróides no tratamento da LMT. A metilprednisolona tem a capacidade de atenuar a resposta neuroinflamatória que se instala imediatamente após a lesão, reduzir a peroxidação lipídica e preservar a integridade das estruturas neuronais. Porém, alguns estudos clínicos questionam a eficácia do tratamento com o corticóide, intensificando, desta forma, a busca por abordagens terapêuticas mais eficazes (Hall e Springer, 2004; Fehlings *et al.*, 2014). Há, ainda, abordagens que buscam restituir ou

substituir funções perdidas por meio de transplantes celulares variados (Nakamura e Okano, 2013; Vawda e Fehlings, 2013).

Nas últimas duas décadas, os avanços no entendimento da fisiopatologia da LMT têm conduzido a diversos estudos clínicos de fase I e II. Entre eles, estudou-se a eficácia do tratamento com metilprednisolona, aminoesteróides, gangliosídeo GM1 (Sygen), hormônio liberador de tireotropina, gaciclidina (GK-11, um antagonista de receptores glutamatérgicos NMDA), naloxona (antagonista de receptores opióides) e nimodipina (bloqueador de canais de cálcio do tipo L). Entretanto, estes estudos clínicos não foram conclusivos, pois geraram muitas controvérsias sobre a forma com que foram conduzidos. Vários outros estudos utilizando modelos experimentais pré-clínicos e pacientes humanos, estão explorando outras intervenções celulares, moleculares, farmacológicas ou não farmacológicas, como a descompressão cirúrgica precoce, estimulação elétrica de campo, estratégias neuroprotetoras como riluzole (bloqueador de canais de sódio e minociclina (tetraciclina capaz de bloquear a microglia), inativação de inibição de mielina, bloqueando Nogo e Rho – moléculas inibitórias presentes na mielina, e o transplante de vários substratos celulares na medula espinhal lesada (Lim e Tow, 2007; Giszter, 2008; Lammertse, 2013; Ramer *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014).

1.5 Dor neuropática – uma resposta mal-adaptada

A palavra "dor" geralmente está associada a experiências conscientes de ferimentos ou doença, mas também pode ser usada para descrever o desconforto relacionado a outros sentimentos desagradáveis. Estas circunstâncias diferentes são base de uma antiga incerteza sobre a

forma de pensar sobre a dor e seus mecanismos. Há um legado dos tempos distantes: Aristóteles acreditava que o coração era o responsável por todas as sensações, no entanto Galeno, séculos mais tarde, fazendo uso de estudos experimentais, reconheceu o cérebro como sendo o “órgão do sentido” e caracterizou a dor como uma sensação. Foi apenas após a Idade Média que a anatomia do sistema nervoso passou a receber alguma atenção. Em 1858, Schiff demonstrou que lesões específicas na medula espinhal resultavam na perda independente e separada de reações táteis e daquelas relacionadas à dor. Isso fez com que Schiff propusesse a dor também como uma sensação independente. Esse achado foi confirmado e expandido posteriormente por Brown-Séquard, que documentou a perda da sensibilidade à dor em regiões contralaterais à hemiseção transversa da medula espinhal (Brown-Séquard, 1868). Enfim, nos últimos dois séculos vimos alterações significativas na maneira de pensar sobre a dor, o que levou a uma expansão importante acerca dos conhecimentos dos mecanismos sensoriais. Atualmente, parece razoável considerar a dor como uma sensação específica e uma emoção, iniciada pela atividade de neurônios periféricos e centrais.

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define a dor como “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão”, sendo sempre subjetiva, ou seja, cada indivíduo aprende a aplicar a palavra através das diferentes experiências vividas ao longo da vida. Encontramos duas categorias principais: dor aguda, que se manifesta durante um período relativamente curto, associada a uma lesão em tecido ou órgão e normalmente desaparece quando a causa primária é tratada; e dor crônica, que não tem papel fisiológico e deixa

de ser um sintoma para constituir parte da doença (Iasp, 2014). No contexto desta tese, o foco será dado para a dor crônica, uma vez que é o tipo de dor que acomete os lesados medulares.

No estudo da dor é imprescindível citar a sensibilização central, pois é o estado de hiperexcitabilidade que se estabelece no SNC e resulta no processamento acentuado das respostas nociceptivas e que foi descrito primeiramente por Woolf (1983). Vários mecanismos estão envolvidos nesse processo, no entanto os três mais importantes são: alteração na neurotransmissão glutamatérgica/hipersensibilidade mediada pelos receptores NMDA, perda de interneurônios inibitórios e interações glia-neurônios (Woolf, 1983). Assim, estímulos inócuos são percebidos como dolorosos, fenômeno chamado de alodinia, ou então estímulos normalmente dolorosos provocam dor de maior intensidade, o que define a hiperalgesia (Basbaum *et al.*, 2009).

A dor neuropática é definida como “uma dor iniciada ou causada por lesão primária ou disfunção do sistema nervoso somatosensorial”, sendo que, normalmente, ela se manifesta por dor intensa e persistente, podendo ser espontânea, associada a sensações de queimação e alfinetadas, hiperalgesia e/ou alodinia. Ela resulta de uma neuroplasticidade central e periférica que inclui alterações na expressão dos canais de sódio, aumento do influxo celular de cálcio, alteração das respostas ao glutamato, além do brotamento de novas terminações das fibras A β em lâminas mais superficiais do corno medular dorsal que estabelecem sinapses aberrantes. Como estas fibras A β normalmente conduzem informação gerada por estímulos mecânicos inócuos e a repassam a neurônios nociceptivos de segunda ordem nas lâminas mais profundas do corno dorsal da medula espinhal, as alterações plásticas de

conectividade resultam na interpretação de informação sensorial tátil como sendo nociceptiva (Costigan *et al.*, 2009). Estas alterações plásticas, que acarretam um desarranjo profundo entre as vias ascendentes e descendentes da dor, resultam em atividade ectópica neuronal e hiperexcitabilidade dos neurônios de segunda ordem no corno dorsal para a transmissão sensorial e, conseqüentemente, aumento da percepção dolorosa por estruturas superiores como o tálamo (Basbaum *et al.*, 2009; Costigan *et al.*, 2009).

A dor é um dos sinais cardinais da inflamação. Sabe-se que mediadores inflamatórios liberados localmente após a lesão tecidual podem sensibilizar e estimular diretamente nociceptores localizados nas fibras nervosas de neurônios aferentes primários (Basbaum *et al.*, 2009). Estes mediadores incluem moléculas algícas e hiperalgésicas clássicas, como bradicinina, prostaglandinas e ATP, citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, bem como mediadores recém estudados, como os microRNAs (Park *et al.*, 2014). Assim, a inflamação aguda tem relação direta com o desenvolvimento da dor aguda. A hiperatividade dos neurônios sensoriais primários após a inflamação periférica também irá aumentar a liberação de neurotransmissores (por exemplo, glutamato) e de neuromoduladores, como a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), a partir dos neurônios aferentes primários localizados na medula espinhal e núcleo trigeminal, causando hiperatividade dos neurônios nociceptivos pós-sinápticos – isto é, a sensibilização central, que é responsável pela dor fora do sítio inicial de lesão (Woolf e Salter, 2000). Embora a inflamação aguda produza uma sensibilização central temporária, a dor crônica está associada à sensibilização duradoura que permanece após a inflamação ter sido

resolvida (Christianson *et al.*, 2011). A neuroinflamação no SNC pode ser também neurogênica, uma vez que pode ser gerada pela atividade de neurônios sensoriais primários ou neurônios locais na medula espinhal (Xanthos e Sandkuhler, 2014).

A ativação das células gliais e sua interação com os neurônios têm sido considerados elementos fundamentais na dor crônica. Estudos recentes implicam três tipos de células gliais no desenvolvimento e manutenção da dor crônica: microglia e astrócitos no SNC e células gliais satélites no gânglio da raiz dorsal (Berta *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014). Das células residentes no SNC, as primeiras a responder são as microglias, seguidas pelos astrócitos. Além disso, as síndromes dolorosas estão associadas com a reação glial, a fosforilação de MAPKs e a síntese de mediadores gliais, como citocinas e quimiocinas, e sua liberação para o espaço extracelular (Figura 2) (Gao e Ji, 2009; Gosselin *et al.*, 2010; Taves *et al.*, 2013).

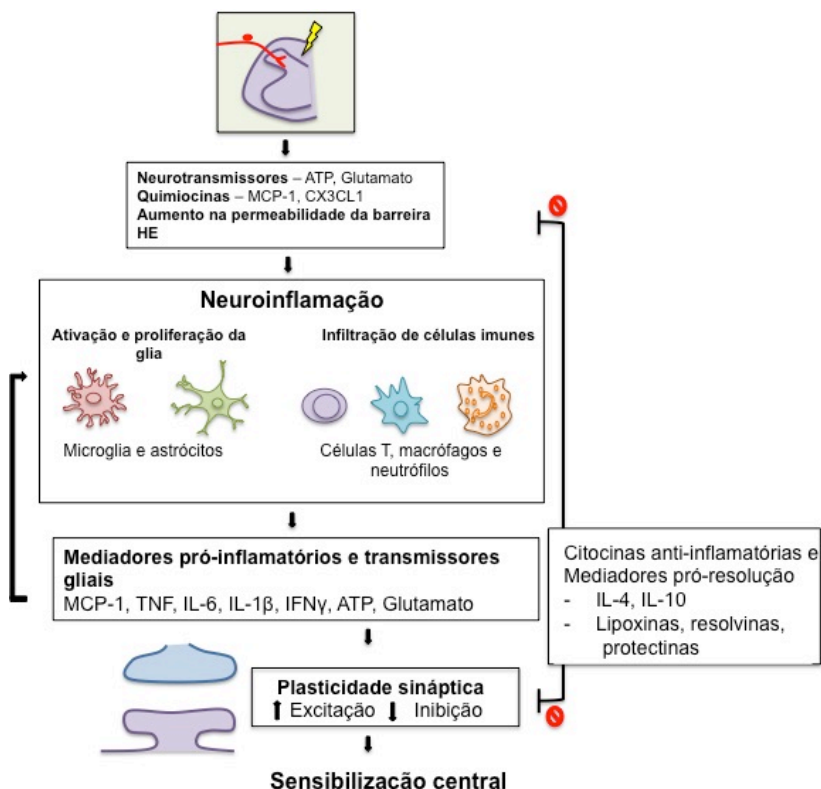


Figura 2. Neuroinflamação e desenvolvimento da dor crônica. A lesão no SNC resulta em um quadro inflamatório como resultado da liberação de ativadores gliais (neurotransmissores, quimiocinas, proteases, entre outros) a partir de terminais localizados nos neurônios aferentes primários e/ou pelo prejuízo na barreira hematoencefálica. A neuroinflamação é caracterizada pela ativação da microglia e astrócitos, infiltração de células imunes e a produção de mediadores inflamatórios e gliais como citocinas e quimiocinas, bem como fatores de crescimento, ATP, glutamato e outros, os quais modulam a transmissão sináptica, levando à sensibilização central e aumento da dor. Entretanto, durante o curso de resolução da inflamação, também são produzidas citocinas antiinflamatórias e mediadores lipídicos pró-resolução, a fim de normalizar o quadro inflamatório, a plasticidade sináptica e a dor crônica. Adaptado de (Ji *et al.*, 2014).

Dessa forma, atualmente acredita-se que o desenvolvimento da neuroinflamação – inflamação no sistema nervoso periférico e central – é responsável por gerar e sustentar a sensibilização dos neurônios nociceptivos que levam à dor crônica induzida pela lesão de nervos, lesão medular, câncer, entre outros (Kawasaki *et al.*, 2008; Gao e Ji, 2010; Ji *et al.*, 2014), além de ser uma das causas prováveis de diferentes patologias do SNC, incluindo as doenças de Alzheimer, de Parkinson, a esclerose múltipla e transtornos psiquiátricos (Rivest, 2009).

1.6 Dor após a lesão medular

Para compreender melhor a nossa atual visão da dor decorrente da lesão medular, é interessante olhar para o passado e avaliar o quanto evoluímos nos últimos séculos. No século 17, o conceito de dor baseava-se na visão do filósofo, matemático e cientista francês René Descartes. De acordo com Descartes, a dor era transmitida da periferia, ao longo de fibras dolorosas específicas presentes na medula espinhal, até chegar ao cérebro onde ativa uma região associada à percepção da dor. Corretamente interpretado ou não, este conceito teve um impacto grande que incluía o conceito vigente de dor após uma lesão medular (Siddall, 2009).

Com base nessa ideia de transmissão passiva da sensação ao longo de “fios”, algumas pessoas acreditavam que lesados medulares não poderiam sentir dor se, claramente, eles simplesmente “não sentiam nada”. Afinal, se os “fios” foram cortados, como eles sentiriam dor? Hoje sabemos que a ideia de transmissão passiva da informação sensorial é falsa. Se, em uma cirurgia, a medula espinhal for

acidentalmente seccionada, muito provavelmente o paciente irá desenvolver dor abaixo da área cortada dentro de 6 a 12 meses. Isso porque, em vez de ser um condutor passivo de sinais, o sistema nervoso é plástico e se modifica constantemente reorganizando-se de acordo com a natureza dos sinais aferentes sensoriais. Entretanto, é essa tentativa de adaptação à informação que pode contribuir para o desenvolvimento da dor após a lesão medular.

Felizmente, nossa compreensão acerca da dor e da ciência como um todo evoluiu desde os dias de Descartes. Sabemos que diversas comorbidades podem acometer o indivíduo que sofre uma lesão medular, no entanto, a dor crônica após o trauma impõe redução da qualidade de vida e alto grau de desconforto ao paciente, além de promover alterações emocionais e dificultar a socialização e a vida diária do paciente. Atualmente, várias classificações são propostas para os diferentes tipos de dor que acometem os lesados medulares, o que dificulta a padronização da mesma entre os profissionais que os atendem (Siddall e Finnerup, 2006). A IASP qualifica a dor após a lesão medular em nociceptiva (musculoesquelética e visceral) e neuropática (acima do nível, ao nível e abaixo do nível da lesão medular). A prevalência da dor em lesados medulares situa-se em torno de 69%, sendo que em um terço desses pacientes a dor é caracterizada como severa (Siddall e Finnerup, 2006; Siddall, 2009).

Cerca de 40-50% das pessoas apresentam dor neuropática nos primeiros doze meses após a lesão medular. Embora haja diversas escalas para o diagnóstico clínico desta condição, há alguns critérios em comum que devem ser considerados, sendo eles a dor surgida nos primeiros 12 meses após a lesão medular traumática; dor não

relacionada com movimento, inflamação ou qualquer lesão tecidual; alodinia ou hiperalgesia na área da dor; e relato de, ao menos, um entre os seguintes sintomas de dor: queimação, formigamento, pinçamento, espasmos, congelamento, cócegas (Finnerup, 2013). Assim, sabemos que a dor neuropática transforma a vida do lesado medular e gera tanto estresse físico quanto emocional, o que muitas vezes, o incapacita a trabalhar e impede de levar uma vida normal.

O tratamento farmacológico atual para a dor neuropática decorrente da lesão medular tem buscado atingir alvos em níveis cerebrais, medulares e periféricos na esperança de abolir ou reduzir significativamente a dor. Entretanto, muitos pacientes submetidos a esses tratamentos ainda apresentam efeitos adversos importantes e/ou não declaram melhora significativa dos sintomas. Atualmente, anticonvulsivantes e antidepressivos ainda representam as classes de fármacos mais utilizadas no tratamento das dores neuropáticas, sendo que os anticonvulsivantes como a gabapentina e a pregabalina são as drogas de primeira escolha na lesão medular. Esses fármacos, no entanto, apresentam uma variedade muito grande de efeitos adversos, os quais limitam a sua prescrição e a adesão do paciente ao tratamento (Finnerup *et al.*, 2009; Vranken, 2009).

A gabapentina interage com os canais de cálcio voltagem-dependentes, ligando-se com alta afinidade nas subunidades α_2 de canais de cálcio e também com o receptor glutamatérgico NMDA, reduzindo a transmissão dos sinais nociceptivos. Por conta disso, tem sido o anticonvulsivante mais utilizado para o tratamento da dor neuropática de lesados medulares nos últimos anos (Siddall, 2009; Teasell *et al.*, 2010). É interessante ressaltar que a pregabalina tem mecanismo de ação

similar ao da gabapentina, porém com resultados muito mais satisfatórios, tanto em pacientes com lesão completa quanto incompleta, além de auxiliar nos distúrbios de sono (Siddall *et al.*, 2006).

Como os anticonvulsivantes, os antidepressivos tricíclicos são amplamente utilizados no tratamento da dor neuropática, porém há poucas evidências de eficácia em casos de lesão medular. Alguns tricíclicos, como a amitriptilina, demonstraram eficácia parcial nos pacientes, porém não ficou estabelecido se isso se deu por conta dos efeitos antinociceptivos ou por redução dos sinais da depressão, reduzindo o relato de dor (Rintala *et al.*, 2007).

Outras abordagens, como o emprego de técnicas de neuroestimulação e terapias cognitivas comportamentais, sempre com uma abordagem multidisciplinar do paciente, contribuem para o alívio da dor e a melhora na sua qualidade de vida (Siddall, 2009).

Assim, ainda faltam evidências concretas acerca da eficácia satisfatória do tratamento farmacológico atual da dor neuropática após a lesão medular. Diante disso, a busca por novos alvos terapêuticos, com base em novas evidências fisiopatológicas, se faz necessária e será fundamental para aprimorar o tratamento desta importante consequência da lesão medular.

1.7 Resolução da inflamação

Em termos evolutivos, o sistema imunológico se aperfeiçoou, protegendo o hospedeiro e combatendo de maneira mais efetiva um processo infeccioso, um trauma ou ainda reparando um tecido lesado (Janeway, 2001). Deste modo, a inflamação é uma resposta benéfica do hospedeiro, a qual ocorre em decorrência das possíveis alterações da

integridade do organismo, permitindo a eliminação do agente que causou a infecção ou trauma, e, conseqüentemente, restabelecendo a homeostasia tecidual (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004).

É importante ressaltar que a resposta inflamatória aguda geralmente é auto-limitante, ou seja, seguindo um curso normal de eventos, deve levar à completa homeostase e restauração tecidual. Entretanto, a modulação da resposta imune pelo patógeno, a exposição intermitente aos estímulos inflamatórios e a existência de “defeitos” moleculares na resposta inflamatória podem redirecionar a resolução fisiológica de um exsudato inflamatório para a formação de um granuloma ou formação cicatricial, ou ainda levar à inflamação crônica associada ao dano ou remodelação tecidual e à perda permanente da função tecidual normal. Assim, a resposta inflamatória lembra a execução de um programa de “checklist”, o qual verifica a natureza do insulto, monitora a progressão do acúmulo de neutrófilos e inicia a resolução e reparo da lesão. Uma variedade ampla e extensa de mediadores clássicos, entre os quais os leucotrienos e as prostaglandinas, são conhecidos por iniciar o processo inflamatório e amplificar os sinais cardinais da inflamação (dor, calor, rubor, edema) (Medzhitov, 2008).

Por outro lado, mecanismos fisiológicos limitam a extensão e a duração da resposta inflamatória, seja por contrabalancear a extensão da inflamação (os chamados mecanismos anti-inflamatórios) e/ou promover ativamente o término ou a resolução da inflamação. Esses mecanismos, conhecidos como mecanismos pró-resolução, reduzem o recrutamento de granulócitos para o foco da inflamação, limitando seu estado de ativação; estimulam o recrutamento não-flogístico de

monócitos, ou seja, sem a participação de mediadores pró-inflamatórios; induzem a fagocitose de microorganismos e células apoptóticas por macrófagos e aumentam a saída dos fagócitos do tecido inflamado pelos vasos linfáticos, estimulando a expressão de moléculas envolvidas na defesa antimicrobiana. No entanto, é importante ter em mente que todos os mediadores pró-resolução são anti-inflamatórios, mas o contrário não é verdadeiro. Durante muitas décadas acreditou-se que os mediadores lipídicos eram maléficos na inflamação e que drogas anti-inflamatórias, como glicocorticóides e anti-inflamatórios não esteroidais, funcionavam na clínica apenas por bloquearem a formação desses lipídeos “maus”, como os eicosanóides. Em textos médicos dos séculos XI e XII já se encontrava a noção de tratar a inflamação com “resolventes”, para ajudar na cura das doenças. Mas o conceito de estimular a resolução da inflamação parecia perdido até que, mais recentemente, as propriedades pró-resolução e as estruturas químicas de alguns novos mediadores endógenos foram descobertas (Buckley *et al.*, 2014). Assim, sabendo-se que nem todos os eicosanóides são pró-inflamatórios e que haviam, sim, produtos da via de lipoxigenase com propriedades anti-inflamatórias, o avanço dos estudos da inflamação aguda demonstrou a existência de novas vias biosintéticas para a produção de mediadores lipídicos derivados de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs). Os mediadores pró-resolução, nomeados resolvinas, protectinas e maresinas, são derivados dos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexanóico (DHA), enquanto o ácido araquidônico dá origem às lipoxinas (Willoughby *et al.*, 2000; Serhan, 2007; Serhan *et al.*, 2007; Serhan *et al.*, 2008) (Figura 3). Estes mediadores pró-resolução são formados através de vias transcelulares específicas estabelecidas em períodos de

tempo específicos durante o transcorrer da resposta inflamatória (Bannenberg e Serhan, 2010).

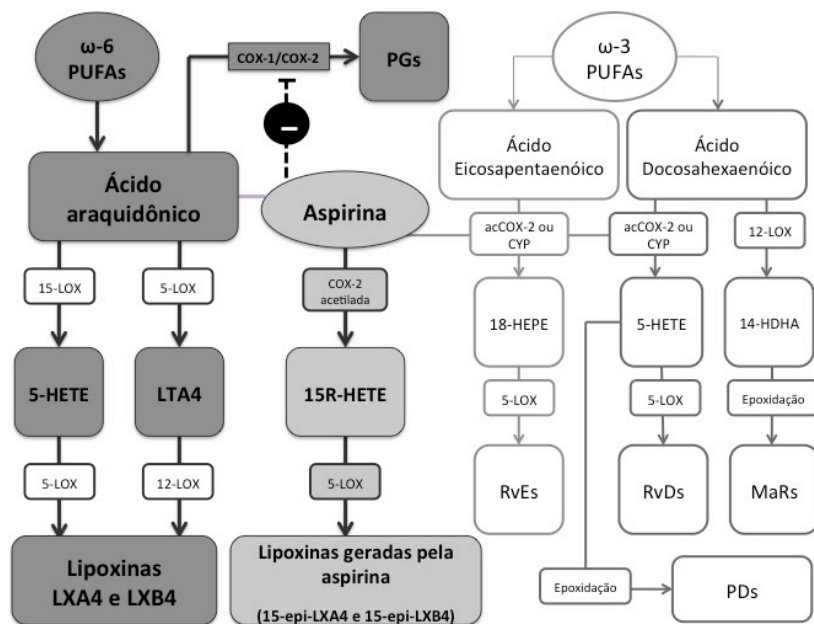


Figura 3. Vias de formação dos mediadores lipídicos pró-resolução. O ácido araquidônico é derivado do lipídeo ômega-6 (ω -6) e pode ser convertido em lipoxinas pela ação das lipoxigenases. Já o lipídeo ômega-3 (ω -3) dá origem aos ácidos eicosapentaenoico, que forma as resolvinas da série E, e docosahexaenoico, responsável pela formação das resolvinas da série D, protectinas e maresinas, que levam à formação das resolvinas da série E e D, respectivamente. COX: ciclooxigenase; LOX: lipoxigenase; HETE: ácido eicosatetraenoico; acCOX-2: COX-2 acetilada; CYP: citocromo P450; LXA4: lipoxina A4; RvEs: resolvinas série E; RvD: resolvinas série D; MaRs: maresinas; PDs: protectinas. Traduzido de (Martini *et al.*, 2014).

1.8 Lipoxinas

Em 1984, Serhan e colaboradores demonstraram pela primeira vez que a interação entre as vias da 5- e 15-lipoxigenase levava à

formação de uma nova série de compostos derivados do ácido araquidônico em leucócitos humanos, que poderiam regular funções celulares específicas. Os pesquisadores deram a dois desses compostos o nome de lipoxina A e lipoxina B (Serhan *et al.*, 1984). A partir desse estudo e com a intensificação das pesquisas acerca destes compostos, hoje sabemos que as lipoxinas são compostos endógenos, membros de uma família de eicosanóides, e que participam de diversos eventos relacionados ao sistema imunológico. Dessa forma, atualmente os representantes principais são a lipoxina A4 (LXA4) e a lipoxina B4 (LXB4), além da 15-epi-lipoxina A4 e da 15-epi-lipoxina B4, formadas pela COX-2 acetilada pela aspirina (Claria e Serhan, 1995; McMahon *et al.*, 2001).

A enzima 15-lipoxigenase (15-LOX) produz, a partir do ácido araquidônico, um intermediário chamado de 15-HPETE, o qual é convertido pela 5-lipoxigenase (5-LOX) dos neutrófilos a lipoxina A4. Além disso, ela também pode ser produzida pela ação da 12-lipoxigenase (12-LOX) das plaquetas, convertendo leucotrieno A4 (LTA4) em LXA4 e LXB4. A acetilação da COX-2 pela aspirina em células endoteliais e epiteliais não apenas inibe a formação de prostaglandinas e tromboxanos como leva à formação de 15R-HETE, o qual é convertido pela 5-LO em 15-epi-lipoxina (lipoxina gerada pela aspirina ou *aspirin-triggered lipoxin*, ATL). Outras fontes para a síntese de lipoxinas que podem ser liberadas no sítio de lesão estão ligadas ao armazenamento de precursores em membranas de células inflamatórias (Serhan, 2005; Ryan e Godson, 2010).

Em áreas inflamadas, os neutrófilos podem interagir com outras células vizinhas para produzir lipoxinas. Quando geradas pela interação

célula – célula, ou por biossíntese transcelular, as lipoxinas impedem a diapedese de neutrófilos e seu recrutamento para os tecidos. Sabe-se que os neutrófilos mudam seu fenótipo e modificam o perfil de produção de mediadores lipídicos de acordo com as células e substratos presentes no meio em que se encontram como, por exemplo, neutrófilos presentes em exsudatos inflamatórios que passam a produzir lipoxinas e resolvinas em vez de leucotrienos. Outros tipos celulares podem gerar lipoxina quando expostos a citocinas e fatores de crescimento específicos ou, no caso dos macrófagos, por exemplo, quando fagocitam leucócitos apoptóticos (Serhan *et al.*, 2008).

A lipoxina A4 se liga a um receptor acoplado a proteínas G, chamado receptor de lipoxina (ALX/FPR2), também conhecido como FPR1, o qual faz parte da superfamília de receptores de formil peptídeo (Chiang *et al.*, 2003). Os receptores FPR2 estão expressos em diversos tecidos nos quais a LXA4 exerce importantes funções regulatórias do processo inflamatório, como o endotélio, epitélio, tecido pulmonar, coração, fígado, baço, além de tipos celulares como monócitos, neutrófilos, fibroblastos e astrócitos (Chiang *et al.*, 2006; Svensson *et al.*, 2007; Serhan *et al.*, 2011). A LXA4 foi o primeiro ligante endógeno identificado para o receptor ALX/FPR2, quando sítios específicos de ligação ao mediador foram identificados em neutrófilos humanos isolados e caracterizados como responsáveis pelas suas funções específicas nessas células (Fiore *et al.*, 1992). As lipoxinas também podem atuar nos receptores para cisteinil-leucotrienos (CysLT) (Gronert *et al.*, 2001; Maderna e Godson, 2009) e no receptor nuclear aril hidrocarboneto (AhR, do inglês, *aryl hydrocarbon receptor*) (Schaldach *et al.*, 1999). A ativação do AhR pela LXA4 inibe a

resposta imune inata de células dendríticas por aumentar a expressão do fator supressor de sinalização de citocinas-2 (SOCS-2), pertencente a uma família de proteínas que alteram e inibem respostas de citocinas, que estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento de dor (Machado *et al.*, 2006). Além disso, trabalho recente de nosso departamento demonstrou que a LXA4 também pode interagir com o receptor canabinóide CB1, no qual atua como potente modulador alostérico (Pamplona *et al.*, 2012).

Entretanto, o receptor ALX/FPR2 é um receptor não convencional e versátil, dada a diversidade de ligantes e o número de sinalizações contrastantes que comanda. As ações pró-resolução da anexina A1 e da LXA4, são mediadas pela ligação a esse receptor e incluem a apoptose de neutrófilos e a eferocitose de macrófagos (processo pelo qual células apoptóticas têm seus corpúsculos apoptóticos removidos e degradados) (Chiang *et al.*, 2006; Serhan *et al.*, 2008). Ao mesmo tempo, respostas pró-inflamatórias relacionadas a ligantes como a proteína amiloide sérica (SAA) também podem ser mediadas pelo mesmo receptor (He *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2011). A afinidade de ligação destas outras moléculas ao receptor ocorre distintamente e em diferentes locais de interação, facilitando a ativação de diversas vias de sinalização dependendo do tipo celular (Bae *et al.*, 2003). Assim, a sinalização intracelular do ALX/FPR2 que segue a ligação da LXA4 é um campo com muitas lacunas, tendo vias específicas para cada tipo celular (Fiore e Serhan, 1995).

1.9. Lipoxinas e a dor

A ativação do ALX/FPR2 pela LXA4 impede o recrutamento

de neutrófilos, promovendo a resolução da inflamação por estimular macrófagos e monócitos a realizarem fagocitose sem que liberem citocinas ou quimiocinas. A LXA4 também reduz a ativação da via do NF- κ B, além de bloquear a fosforilação das MAPKs p38 e ERK (Serhan, 2005), vias de sinalização diretamente relacionadas com a lesão secundária que se desenvolve após a lesão medular (Genovese *et al.*, 2008). Embora atualmente saibamos muito sobre como a dor inflamatória é iniciada por mediadores pró-inflamação, pouco sabemos sobre como esse processo é resolvido. Da mesma forma, sabemos que a dor crônica não é apenas uma extensão da dor inflamatória, mas o resultado de mudanças persistentes no processamento da dor. Assim, ter como alvo a fase de transição da dor aguda para crônica – como, por exemplo, reduzindo a inflamação inicial – pode ser crucial para a prevenção do desenvolvimento da dor persistente.

Vários estudos demonstram que muitos dos fatores atenuados pela interação dos mediadores lipídicos pró-resolução com seus receptores, entre eles a LXA4 com o ALX/FPR2, podem atenuar a dor através de diversos mecanismos atuando em diferentes células por reduzir a inflamação, a ativação glial e a plasticidade sináptica da medula espinhal (Xu *et al.*, 2010; Ji *et al.*, 2011; Lima-Garcia *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2013).

Svensson e colaboradores (2007) demonstraram que a administração intratecal de LXA4 promove efeito antihiperálgico em um modelo de dor inflamatória através da ativação dos receptores ALX/FPR2 e prevenção da ativação de vias de MAPKs nos astrócitos da medula espinhal (Svensson *et al.*, 2007). Entretanto, estudos que relacionem a ação de mediadores lipídicos com a prevenção e/ou o tratamento da dor

neuropática são escassos. Hu e colaboradores (2012) demonstraram, em um modelo de dor óssea oncológica, que a administração intratecal de LXA4 reduziu os níveis de RNAm para IL-1 β , com consequente atenuação da sensibilidade nociceptiva mecânica (Hu *et al.*, 2012). Ainda, a administração intratecal contínua de LXA4 também foi capaz de diminuir a expressão de NF- κ B e de citocinas pró-inflamatórias no gânglio da raiz dorsal (GRD) de ratos submetidos à compressão crônica do GRD (Sun *et al.*, 2012). Ainda, injeções intratecais repetidas de ATL reduziram a hiperalgesia térmica induzida pela constrição do nervo ciático, por inibição da ativação do inflamassoma NALP1 e da maturação de IL-1 β (Li *et al.*, 2013).

Em relação à lesão medular, os raros estudos existentes dedicam-se a avaliar, principalmente, a ação dos ácidos graxos poliinsaturados na recuperação locomotora e neuroproteção da medula espinhal (King *et al.*, 2006; Ward *et al.*, 2010; Figueroa *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2013). Mais recentemente, Figueroa e colaboradores (2013) demonstraram que uma dieta enriquecida em lipídeos ômega 3 foi capaz de reduzir a hiperalgesia térmica em ratos após a lesão medular, além de restaurar o balanço dos níveis de endocanabinóides em 8 semanas após a lesão.

Na dor neuropática, a inflamação que ocorre nas lâminas superficiais da medula espinhal é um ponto determinante para o processamento e a transmissão dos sinais nociceptivos, sendo que as células da glia desempenham um importante papel nas respostas neuroinflamatórias. Assim, a ativação dessas células pode ser o fenômeno responsável pela liberação de citocinas pró-inflamatórias e a manutenção da sensibilização central. Diante do exposto, o presente

estudo buscou verificar se a LXA4 seria capaz de reduzir a hipersensibilidade nociceptiva associada à lesão medular.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo foi investigar o possível efeito benéfico da LXA4 sobre a dor neuropática decorrente da lesão medular traumática experimental, bem como os mecanismos celulares e moleculares envolvidos.

2.2. Objetivos específicos

Com o intuito de alcançar o objetivo geral proposto, o estudo foi desenvolvido em etapas, conforme se segue abaixo:

- Avaliar o desenvolvimento da resposta hiperalgésica a estímulos mecânicos nos animais falso-operados e lesados medulares em diferentes períodos após a lesão da medula espinhal e os efeitos da administração intratecal de lipoxina A4 sobre esse parâmetro;
- Determinar os níveis de RNAm para o receptor ALX/FPR2 na medula espinhal antes e após a indução da lesão medular;
- Avaliar a participação do receptor ALX/FPR2 nos efeitos antinociceptivos conferidos pelo tratamento com lipoxina A4 após a lesão medular;
- Investigar os efeitos da lipoxina A4 sobre a produção de citocinas pró e antiinflamatórias e na ativação de células gliais na medula espinhal após a lesão;
- Determinar as ações da lipoxina A4 em células da microglia e astrócitos, avaliando seus efeitos em culturas de células.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos *Rattus norvegicus*, variedade Wistar (270 – 280 g), provenientes do Biotério do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e camundongos *Mus musculus*, variedade CD1 (25 – 32 g), provenientes do Laboratório Charles River (USA), ambos machos. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas). Todos os estudos seguiram os termos da Lei Federal nº 11.794, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, bem como as recomendações do Guia de Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais do *National Institutes of Health (NIH)* dos Estados Unidos da América (*Publication No. 85-23*, revisado em 1996). Os protocolos experimentais utilizados foram aprovados pelos comitês de ética no uso de animais da UFSC (CEUA; protocolo PP00686) e da Duke University (*Animal Care Committee of Duke University Medical Centre*; protocolo A089-12-03). As metodologias disponíveis e utilizadas para o desenvolvimento deste estudos foram diferentes para ratos e camundongos. Por conta disso, a fim de facilitar a compreensão, estas serão divididas abaixo de acordo com cada espécie.

3.2. Metodologias empregadas para ratos

3.2.1 Modelo experimental de hemissecção da medula espinhal

Para a indução da lesão da medula espinhal foi utilizado um modelo experimental descrito originalmente por Christensen e colaboradores (1996), com modificações. Os animais foram anestesiados

por via intraperitoneal com uma mistura 1:1 de quetamina (Dopalen®, Sespo Indústria e Comércio Ltda, SP, Brasil) e xilazina (Dopaser®, Laboratórios Calier S.A., Barcelona, Espanha; 70 e 10 mg/kg, respectivamente). A temperatura corpórea foi mantida constante com auxílio de uma manta aquecedora colocada embaixo do animal. Sob completa anestesia, foi realizada tricotomia e assepsia do dorso do animal, seguido pela administração subcutânea de anestésico local e vasoconstritor (cloridrato de lidocaína 2% + adrenalina 1:50000, Xylestesin®, Cristália, SP, Brasil). Foi então realizada uma incisão de aproximadamente 3 cm na linha média da região dorsal e removido o tecido gorduroso presente. O anestésico local foi novamente administrado, por via intramuscular, e a coluna vertebral foi exposta, através da dissecação dos músculos que se inserem nos segmentos vertebrais torácicos T₈ a T₁₂, e fixada utilizando-se um fórceps. Através do emprego de uma broca dentária, foi realizada a abertura de um pequeno orifício na vértebra T₁₀, permitindo o acesso à medula espinhal. Através desse orifício uma seringa contendo uma agulha hipodérmica de 28G foi posicionada dorso-ventralmente na linha central da medula e puxada lateralmente para garantir que todo o lado esquerdo da medula espinhal fosse seccionado. Concluído o procedimento a sutura foi realizada por planos (muscular e pele). Os animais falso-operados (controles) foram submetidos ao mesmo protocolo descrito acima, porém sem a introdução da agulha e secção da medula espinhal. Os animais foram mantidos em ambiente limpo durante todo o período pós-cirúrgico e observados diariamente para evitar desconforto e infecção. Os cuidados pré- e pós-operatórios seguiram o protocolo de Santos-

Benito et al. (2006), bem como as normas do MASCIS (*Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study*) e CEUA-UFSC.

3.2.2. Avaliação da Atividade Locomotora

A atividade locomotora de cada animal lesado ou falso-operado foi avaliada em diferentes momentos utilizando a escala de atividade locomotora BBB (Basso *et al.*, 1995), de acordo com anexos 1 e 2. Dois examinadores treinados participaram de cada sessão de teste e foram posicionados de forma a permitir a observação de cada lado do animal através das paredes da caixa de observação. Cada animal foi avaliado no segundo dia pós-cirúrgico e uma vez por semana, durante 28 dias, sendo que cada sessão durou 5 minutos, para reduzir a possibilidade de perda de observação de movimentos importantes. Os animais que permaneceram imóveis por mais de 15 a 20 segundos foram estimulados por leves batidas na parte externa do campo aberto. Caso não respondesse ao estímulo, o animal era posicionado pelos avaliadores no centro da caixa de observação, cuidadosamente, para que não houvesse toque na cauda ou nos membros posteriores do animal, já que isto pode influenciar o desempenho locomotor. O escore diário foi atribuído apenas para a pata posterior esquerda de cada animal.

3.2.3 Avaliação da alteração nociceptiva mecânica

Para avaliar se a hemissecção da medula espinal promovia alterações na sensibilidade mecânica das patas anteriores e/ou posteriores. A mesma foi estimada através da estimulação repetida da superfície plantar ou palmar de cada membro com filamentos de Von Frey. Primeiramente, os animais foram habituados por pelo menos uma

hora nas caixas de observação. Em seguida, foi realizada uma sessão de seleção prévia dos animais baseada em suas respostas a 10 aplicações consecutivas, com intervalo mínimo de 30 segundos entre cada aplicação, com os filamentos de Von Frey (Semmes-Weinstein monofilaments, Stoelting Co., IL, EUA) de 0,4 g e 15 g de força no centro da superfície palmar das patas anteriores e plantar das posteriores. Em cada estimulação, o filamento foi aplicado perpendicularmente à superfície até que o mesmo dobrasse ou suscitasse uma resposta. A retirada da pata em resposta ao estímulo foi considerada como resposta positiva, sendo que o somatório do número de retiradas de cada pata após 10 aplicações do filamento foi considerado como indicativo da intensidade da nocicepção mecânica. Apenas animais que apresentaram até respostas na série de 10 aplicações na sessão de seleção prévia foram incluídos nos experimentos subseqüentes. As alterações na sensibilidade mecânica foram avaliadas em 2, 7, 14, 21 e 28 dias após a cirurgia.

3.2.4. Efeito da administração de lipoxina A4 na hiperalgesia mecânica induzida por lesão medular

Uma vez observado que a lesão medular acarretava em aumento persistente na hipersensibilidade mecânica nas patas posteriores dos animais, realizamos o tratamento intratecal com LXA4 (i.t., 150 e 300 pmol, Cayman Chemical Company, MI, EUA) ou veículo (etanol 0.5% em solução salina tamponada com fosfato 0,01 M, pH 7,2 a 7,4 - PBS), em 4 e 24 horas após o procedimento cirúrgico. Para proceder à avaliação da sensibilidade mecânica com o filamento de Von Frey conforme descrito no item 3.2.3, os animais foram divididos nos seguintes grupos: Falso-operado, lesado, lesado tratado com LXA4 150 pmol, lesado tratado com LXA4 300 pmol, e lesado tratado com veículo.

3.2.5. Extração do RNA total

Para a extração do RNA total (RNAt), amostras da medula espinhal contendo o sítio da lesão bem como as áreas adjacentes (~ 2 cm) e do GRD (L₄ – L₅) de animais não-operados, falso-operados e lesados foram coletadas nos períodos de 2, 7, 14, 21 e 28 dias após o procedimento cirúrgico e homogeneizadas em Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) na proporção de 1 ml do reagente para cada 100 mg de tecido. Adicionou-se 200 µl de clorofórmio ao homogenato, o qual foi submetido à agitação e centrifugação (12.000 x g, 15 minutos, 4 °C). A fase aquosa contendo RNAt foi transferida para um novo tubo, ao qual se adicionou 500 µl de álcool isopropílico. A mistura foi centrifugada (12.000 x g, 15 minutos, 4 °C), o sobrenadante foi removido e o precipitado resultante foi suspenso em 1 ml de etanol 75% gelado. Após nova centrifugação (7.000 x g, 5 minutos, 4°C), o precipitado contendo RNAt foi suspenso em água tratada com 0,1% de dietilpirocarbamato (DEPC), sendo a sua concentração e pureza determinadas pelo espectrofotômetro NanoDrop 1100 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, EUA). Uma vez obtido o RNAt, foi realizado o ensaio de transcrição reversa seguida de reação em cadeia de polimerase em tempo real (PCR em tempo real).

3.2.6. Ensaio de transcrição reversa seguida de reação em cadeia de polimerase em tempo real (PCR em tempo real)

A fim de se avaliar a expressão de RNAm do receptor ALX/FPR2 na medula espinhal (no segmento T₉-T₁₁) e nos gânglios da raiz dorsal (GRD; L₄-L₅) foi realizada a reação em cadeia da polimerase em tempo

real (real-time PCR). Amostras de medula espinhal ou de GRD contendo 2 µg de RNA total foram incubadas com 1 µg de oligo dT (500 µg/ml), 1 µl de dNTPs mix (10 mM) e água ultra pura para um volume final de 12 µl. Para a obtenção do DNA complementar (DNAc), as amostras foram aquecidas a 65°C por 5 minutos, resfriadas a 4°C por 5 minutos para a adição de 4 µl de tampão de primeira fita [250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl e 15 mM MgCl₂), 2 µl de DTT (0,1 M)] e 1 µl de inibidor de RNase. A mistura foi incubada a 37°C por 50 minutos e a reação foi inativada a 75°C por 15 minutos. O DNAc foi estocado a 4°C até a realização da reação em cadeia de polimerase (PCR). A reação de PCR foi realizada para promover a amplificação do DNAc para ALX/FPR2 e para β-actina. Para tal, o DNAc foi amplificado em duplicata utilizando o kit Master Mix TaqMan® Universal PCR (Applied Biosystems, MA, EUA), com sondas (primers - molécula que absorve fluorescência) específicas para ratos, com marcação 3'quencher MGB e FAM para Fpr2 (Rn03037051_gH) e 3'quencher MGB e VIC para o controle endógeno β-actina ACTB (Rn00667869_m1) (Applied Biosystems, MA, EUA). A reação de PCR foi realizada em uma placa de reação óptica de 96 poços (Applied Biosystems, MA, EUA). Cada reação continha 1 µl de DNAc (300 ng), 5 µl de Master Mix (2x), 0,5 µl de sonda Taqman e 3,5 µl de água ultrapura, em um volume final de 10 µl. As amplificações foram realizadas em um termociclador (StepOne Plus; Applied Biosystems, MA, EUA) para 55 ciclos. Os parâmetros do termociclador foram os seguintes: 50 °C por 2 min, 95 °C por 15 s, e 60 °C por 1 minuto. A fluorescência foi coletada a cada ciclo de amplificação e os dados foram analisados utilizando o método 2-

$\Delta\Delta C_t$ para a quantificação relativa (QR). A expressão do gene alvo foi calibrada contra condições encontradas em animais controle.

3.2.7. Análise dos níveis de mediadores inflamatórios

Amostras de medula (segmento T9 - T11) foram removidas 2, 4 e 7 dias após o procedimento cirúrgico e homogeneizadas com PBS contendo Tween 20 (0,05 %), fluoreto de fenilmetilsulfonil 0,1 mM, cloreto de benzometônio 0,1 mM, EDTA 10 mM, e aprotinina A 2 ng/ml. O homogenato foi centrifugado a 3.000 x g por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante armazenado a -80 °C até o momento da análise. Os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α , IL-6 e da citocina antiinflamatória IL-10 foram determinados em ensaios distintos, utilizando-se kits específicos de ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay, R & D Systems, MN, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. A dosagem de proteínas foi realizada com NanoDrop 1100 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, EUA), de modo a ajustar o teor de proteína contido em cada amostra a ser avaliada. Os resultados são expressos em pg/100 mg de tecido.

3.2.8. Dosagem de LXA4 na medula espinhal

A quantificação dos níveis de LXA4 na medula espinhal foi realizada por meio de kit ELISA (Oxford Biomedical Research, EUA). Os tecidos foram homogeneizados em etanol (5 μ l/mg de tecido) e centrifugados por 5 min a 10.000 g. O sobrenadante foi coletado, diluído em água deionizada (acidificada a pH 3,5) e purificado em uma coluna reversa Sep-Pak C18 pré-ativada, com fases móveis água, hexano e formiato de etila, nesta seqüência, com velocidade de eluição de 1 ml/min. A fração formiato de etila contendo a LXA4 extraída foi

evaporada sob atmosfera de gás nitrogênio (N₂) e ressuspensa em tampão de ensaio. As amostras foram incubadas com conjugado HRP-LXA4 (peroxidase) por 1 hora à temperatura ambiente (25 °C) em placa de 96 poços tratada com anticorpos anti-LXA4. Após sucessivas lavagens, a reação foi revelada com uso de substrato TMB, cuja coloração azul é inversamente proporcional à quantidade de LXA4 na amostra (leitura a 650 nm). A quantidade de LXA4 nas amostras foi normalizada pela massa (em mg) de tecido fresco.

3.3. Metodologias empregadas para camundongos

3.3.1. Modelo experimental de hemissecção da medula espinhal em camundongos

A lesão da medula espinhal em camundongos foi realizada de modo semelhante àquela feita em ratos, com algumas modificações, de maneira a se respeitar o preconizado pelo comitê de ética da *Duke University*.

Os animais foram mantidos anestesiados durante todo o procedimento através da inalação inicial de uma mistura de O₂ com gás isoflurano 5%, passando-se a 2 – 3% de isoflurano durante a cirurgia (Forene, Abbott, IL, EUA). Sob completa anestesia, foi realizada tricotomia e assepsia do dorso do animal e então realizada uma incisão de aproximadamente 1 cm na linha média da região dorsal e removido o tecido gorduroso presente. A coluna vertebral foi exposta, através da dissecação dos músculos que se inserem nos segmentos vertebrais T₈ a T₁₂, e fixada utilizando-se um fórceps. Através do emprego de tesoura oftálmica foi realizada a abertura de um pequeno orifício na vértebra T₁₀, permitindo o acesso à medula espinhal. Através desse orifício, uma

seringa contendo uma agulha de 28G foi posicionada dorso-ventralmente na linha central da medula e puxada lateralmente para garantir que todo o lado esquerdo da medula espinhal fosse seccionado. Concluído o procedimento foi realizada a sutura por planos (muscular e pele). Os animais falso-operados (controles) foram submetidos ao mesmo protocolo descrito acima, porém sem a secção da medula espinhal. Os animais foram mantidos em ambiente limpo durante todo o período pós-cirúrgico e observados diariamente para evitar desconforto e infecção. Os cuidados pré- e pós-operatórios seguiram o protocolo de Santos-Benito et al. (2006), bem como as normas do MASCIS (*Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study*) e do comitê de ética local (IACUC – Duke University).

3.3.2. Avaliação das alterações na nocicepção mecânica

Para avaliação das alterações nociceptivas mecânicas, os animais foram habituados nas caixas de observação (caixas de acrílico sobre uma base metálica elevada) por, no mínimo, duas horas. Em seguida, uma série de filamentos de von Frey (Semmes-Weinstein monofilaments, Stoelting Co., IL, EUA) calibrados para produzir forças de 0,16; 0,4; 0,6; 1,0 e 2,0 gramas foram aplicados perpendicularmente ao centro da superfície plantar da pata traseira dos animais. Foram utilizadas seis aplicações consecutivas, com intervalos de no mínimo 30 segundos entre elas, utilizado como primeiro filamento o de 0,16 g e aumentando ou diminuindo o calibre do filamento seguinte conforme a ausência ou presença de resposta frente ao estímulo anterior, respectivamente. Reações de retirada da pata provocadas pela

estimulação com um filamento foram consideradas respostas positivas ao estímulo. A sensibilidade mecânica foi determinada através do cálculo da força que ocasionava 50% do limiar de retirada da pata (g) (Chaplan *et al.*, 1994).

As avaliações foram realizadas em animais falso-operados e animais lesados tratados com veículo ou LXA4 por via intratecal. O protocolo de tratamento e avaliação foi realizado conforme o esquema abaixo:



Figura 4. Esquema de tratamento e avaliação comportamental por filamentos de von Frey realizado em camundongos CD1. Os animais receberam duas injeções intratecais de LXA4 300 pmol ou veículo em 4 e 24 horas após a indução da lesão medular. A avaliação da alteração comportamental foi realizada em 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a lesão. No 35º dia após a lesão e a avaliação comportamental, os animais receberam nova injeção i.t. de LXA4 ou veículo, e foram novamente avaliados em 1, 3, 6 e 24h após a injeção.

3.3.3. Administração intratecal de lipoxina A4

O tratamento dos animais com LXA4 (300 pmol) ou veículo (etanol 0.5% em PBS) foi feito por via intratecal, entre os segmentos vertebrais lombares L4 e L5, em 4 e 24 horas após o procedimento cirúrgico.

3.3.4. Silenciamento gênico do receptor ALX/FPR2

O silenciamento gênico do receptor ALX/FPR2 foi realizado através da administração de RNA de interferência (siRNA) para o receptor. OALX/FPR2 siRNA (FPR2 *Trilencer-27 Mouse siRNA*, Origene, MD, EUA) ou seu respectivo controle (*Trilencer-27 Universal Scrambled Negative Control siRNA*, Origene, MD, EUA) foram preparados em água livre de RNase e misturados com polietileneimina (PEI, MBI Fermentas, MD, EUA), para aumentar a penetração nas membranas celulares e reduzir a degradação, o qual foi dissolvido em glicose 5%, e mantidos em repouso durante 15 minutos (Xu *et al.*, 2010). Imediatamente após o preparo, o tratamento foi realizado, por via intratecal conforme descrito anteriormente, conforme o esquema abaixo:

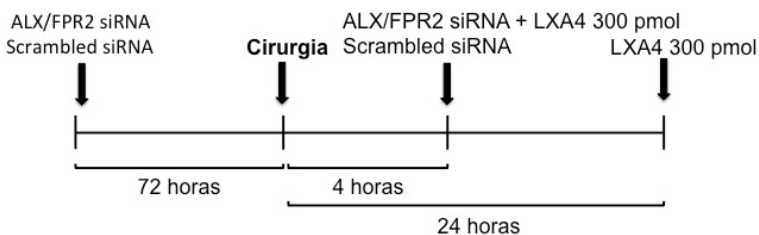


Figura 5. Esquema de tratamento realizado em camundongos CDI para silenciamento gênico do receptor ALX/FPR2 e avaliação dos efeitos da LXA4. Os animais foram tratados por via intratecal com ALX/FPR2 siRNA ou Scrambled siRNA 72 horas antes da indução da lesão medular. Quatro horas após a cirurgia, foi realizada nova injeção i.t. de ALX/FPR2 siRNA ou Scrambled siRNA em combinação com LXA4 300 pmol, e em 24 horas após a lesão os animais receberam uma nova administração de LXA4 300 pmol (i.t.).

3.3.5. Extração do RNA total

Para a extração do RNA total (RNA_t) foi utilizado o kit Direct-zol RNA™ MiniPrep (Zymo Research Corporation, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Amostras da medula espinhal de animais falso-operados e lesados contendo o sítio da lesão e as áreas adjacentes (~ 1 cm) foram coletadas nos períodos de 7 dias após o procedimento cirúrgico e homogeneizadas em 300 µL de Trizol® (Invitrogen, CA, EUA). Ao homogenato, adicionou-se 1 volume de etanol 100% para PCR. A mistura foi transferida para uma coluna Zymo-Spin™ IICG e centrifugada (10,000 x g, 30 segundos). O sobrenadante foi desprezado e a coluna recebeu duas lavagens com tampões específicos do kit, seguidas por centrifugação (10.000 x g, 30 segundos). Após uma terceira lavagem, a coluna foi centrifugada por dois minutos (10.000 x g), para garantir a remoção completa do tampão de lavagem. Em seguida, foram adicionados 25 µL de água livre de DNase e RNase à coluna posicionada em tubos livres de RNase, a qual foi centrifugada a 12.000 x g por 30 segundos. Após a centrifugação, a solução contendo RNA_t teve sua pureza e concentração determinadas pelo espectrofotômetro NanoDrop 1100 (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA).

3.3.6. Ensaio de transcrição reversa seguido de reação em cadeia de polimerase em tempo real (PCR em tempo real)

Para a obtenção do DNA complementar (DNA_c), utilizamos o kit *iScript cDNA Synthesis*® (BioRad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Amostras de medula espinhal, micróglia e astrócitos contendo 300 ng de RNA total foram aquecidas a 25°C por 5

minutos, a 42 °C por 30 minutos e a 85 °C por 5 minutos. O DNAc foi estocado a 4°C até a realização da reação em cadeia de polimerase (PCR). A reação de PCR foi realizada para promover a amplificação do DNAc para ALX/FPR2, Iba-1 (molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado1), GFAP (proteína glial fibrilar ácida), TNF- α (fator de necrose tumoral – alfa) e GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). Para tal, o DNAc foi amplificado com sondas específicas para camundongos, com marcação 3'quencher MGB e FAM, para FPR2, Iba-1, GFAP, TNF- α e 3'quencher MGB e VIC para o controle endógeno GAPDH (Rn00667869_m1) (Applied Biosystems, MA, EUA). A reação de PCR foi realizada em uma placa de reação óptica de 96 poços (Applied Biosystems, MA, EUA). Cada reação continha 4,5 μ l de DNAc, 7,5 μ l de Master Sybr, e 4,5 μ l de primer (sonda Taqman), em um volume final de 15 μ l. As amplificações foram realizadas em um termociclador (T100™ Thermal Cycler, BioRad, CA, EUA). A expressão do gene alvo foi calibrada contra condições encontradas em animais controle.

3.3.7. Eletroforese em gel de agarose

Após a extração do RNAt, as amostras de medula, astrócitos e micróglia foram submetidas a eletroforese em gel de agarose para detecção do receptor ALX/FPR2. Para a obtenção do DNAc, cada reação continha 5 μ M de primer específico para FPR2 (Rn00561137_m1), TaqRed Mix® e água ultrapura para um volume final de 19 μ l. As amplificações foram realizadas em um termociclador (T100™ Thermal Cycler, BioRad, CA, EUA).O gel de agarose 1% foi

preparado em tampão TAE - Tris-Acetato EDTA (pH 8,5) contendo SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen, CA, EUA) e solidificado em compartimento apropriado. Após a solidificação, a bandeja contendo o gel foi preenchida com tampão TAE e 9 µl de cada amostra foi adicionada, além de uma amostra de padrão EasyLadder I (Bioline, MA, EUA). A corrida foi realizada a 40 – 60V e os fragmentos de DNA foram visualizados em fotodocumentador ChemiDoc MP (BioRad, CA, EUA).

3.3.8. Imunoistoquímica

A ativação de astrócitos e microglia foi detectada em amostras da medula espinhal obtidas sete dias após a cirurgia. Os animais foram anestesiados profundamente com isoflurano e perfundidos através da aorta ascendente com solução PBS, seguido por tampão fosfato 0,16 M acrescido de paraformaldeído (PFA) 4% com ácido pícrico 1,5%. Após a perfusão dos animais, as medulas espinhais foram removidas, fixadas em paraformaldeído 4% por 4 h e incubadas em solução de sacarose 30% por 24 horas a 4°C. A seguir, as amostras foram emblocadas em TissueTek® (Tissue-Tek® O.C.T™ Compound, Sakura, Holanda), seccionadas em criostato e os cortes teciduais (espessura de 30 µm) foram depositados sobre lâminas para microscópio (Superfrost/Plus, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). A seguir, os cortes foram incubados com solução PBS contendo 0.3% de Triton X e 2% de soro normal de cabra (1 hora, temperatura ambiente) para bloqueio de reações inespecíficas falso-positivas. Após o bloqueio, os cortes foram incubados com anticorpo anti-IBA1 (1:1000, coelho, Wako Pure Chemical Industries, EUA) ou anti-GFAP (1:1000, camundongo,

Millipore Bioscience Research Reagents, Darmstadt, Alemanha) por 18 horas a 4°C. Após a incubação e três lavagens sucessivas com tampão PBS, os cortes foram incubados com os anticorpos secundários anti-coelho conjugado com Cy3 ou anti-camundongo conjugado com FITC (1:400, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Reino Unido), durante uma hora em temperatura ambiente. Após a imunomarcação, foi adicionado 4', 6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI; 0.1 mg/ml; Sigma-Aldrich Corporation, MO, EUA) por 5 minutos a temperatura ambiente para marcação dos núcleos celulares. As imagens foram captadas através de microscópio óptico com câmera digital acoplada (DS-Fi1; Nikon, Japão). Para cada corte de tecido foram obtidas de 4-5 imagens. As imagens digitalizadas foram transferidas para o computador e a intensidade média da marcação foi determinada para cada imagem através do programa NIH ImageJ 1.36b (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) e os resultados expressos em unidades arbitrárias.

3.3.9. Experimentos com cultura primária de microglia

Culturas de microglia foram preparadas a partir do córtex cerebral de camundongos CD1 neonatos (segundo dia pós-natal; P2). Os hemisférios cerebrais foram isolados e transferidos para solução balanceada de Hanks (HBSS, *Hanks balanced salt solution*, – Life Technologies, MA, EUA) gelada e as meninges foram cuidadosamente removidas. Os tecidos foram então partidos em pedaços de aproximadamente 1 mm, triturados, filtrados em peneira de 100 µm e coletados por centrifugação a 1.200 x g por 5 minutos. O precipitado de células foi dissociado com uma pipeta, suspenso em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM – Life Technologies, MA, EUA) com

alta concentração de glicose, contendo 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina e 1% de anfotericina B, e filtrado em tela de 10 µm, e o volume do filtrado foi ajustado para 25 mL. Adicionou-se 5 mL de meio DMEM em frascos T75 para cultura de células e 5 mL do preparado celular, totalizando 10 mL por frasco, os quais foram mantidos em 37 °C e 5% CO₂. As culturas foram mantidas por cerca de 4 semanas, com renovação do meio DMEM uma vez por semana. Para os experimentos, os frascos foram agitados por 3 horas em agitador para cultura celular (200 rpm) a 37°C. O meio de cultura contendo as células em suspensão foi removido e transferido para frascos de 50 mL e centrifugado a 1200 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado celular foi ressuspensão em meio DMEM. O número de células foi contado em câmara de Neubauer, o volume foi ajustado para se obter uma densidade de 2.5×10^5 células/mL e as células foram então depositadas em placas de 12 poços e mantidas por 3 – 5 dias até a realização dos experimentos.

Para análise da liberação de TNF-α e expressão de p-p38 (isoforma ativa da MAPK p38), o meio de cultura das placas foi substituído por meio OptiMEM (Life Technologies, MA, EUA), contendo 1% de penicilina/estreptomicina, ao qual foi adicionado LXA4 (10 ou 100 nM) durante 30 minutos, antes da estimulação das células com IFN-γ (20 ng/mL) por 3 horas. Os níveis de TNF-α foram determinados utilizando-se kit específico de ELISA (enzyme immuno sorbent assay, R & D Systems, MN, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Os resultados são expressos em pg/mL.

Para avaliação da expressão de MAPK p-p38, as células foram removidas da placa utilizando-se tampão de lise RIPA (*RIPA Lysis and*

extraction buffer, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). A concentração de proteínas das amostras foi dosada através do método Pierce BCA (*BCA Protein Assay Kit*, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). Em seguida, as amostras contendo quantidades iguais de proteína (50 µg) foram separadas por eletroforese em gel SDS-PAGE (4% - 15%, BioRad, CA, EUA). As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por eletroforese, utilizando-se corrente constante de 300 mA, durante 120 min. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com tampão TBS-T contendo 1% de albumina bovina sérica por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários específicos anti-p-p38 e anti-GAPDH (1:10.000, Millipore Bioscience Research Reagents, Darmstadt, Alemanha) por 16 – 18 horas, sob agitação a 4°C. Após a incubação com anticorpos primários, as membranas foram lavadas três vezes consecutivas com tampão TBS-T e em seguida foram incubadas com os anticorpos secundários específicos conjugados a uma peroxidase, durante 1 hora em temperatura ambiente e sob agitação. As bandas foram visualizadas por aumento da quimioluminescência, utilizando o sistema de detecção *SuperSignal West Dura* (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) e o fotodocumentador ChemiDoc MP (BioRad, CA, EUA). A quantificação da intensidade dos sinais das bandas foi determinada por densitometria, utilizando-se o programa Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA).

A expressão do receptor ALX/FPR2 foi determinada através de imunofluorescência. As células foram fixadas com solução PFA 4% contendo 0.1% de ácido pícrico por 20 minutos, e então lavadas três vezes com tampão PBS. As lamínulas foram então incubadas por 30

minutos, em temperatura ambiente, com solução contendo 10% de soro de cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Reino Unido), 2% de albumina bovina e 0,4% de Triton X100 (ambos Sigma-Aldrich Corporation, MO, EUA). O anticorpo primário anti-ALX/FPR2 (1:200, Coelho, NLS1878SS, Novus Biologicals, CO, EUA) foi diluído em tampão PBS com 5% de soro de cabra, 1% albumina bovina e 0.2% Triton X100, e incubado por 18 horas a 4°C. O correspondente anticorpo secundário anti-coelho conjugado com Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Reino Unido) foi diluído em tampão PBS com 2% de soro de cabra, 0.4% albumina bovina e 0,08% Triton X100, e incubado por 1 hora em temperatura ambiente. Após a imunomarcção, 4', 6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI; 0,1 mg/ml; Life Technologies, MA, EUA) foi adicionado por 5 minutos a temperatura ambiente para marcação dos núcleos celulares. As imagens foram captadas através de microscópio óptico com câmera digital acoplada (DS-Fi1; Nikon, Japão).

3.3.10. Experimentos com cultura primária de astrócitos

As culturas de astrócitos foram preparadas de maneira semelhante às culturas de microglia, com poucas modificações. Utilizou-se o córtex cerebral de camundongos CD1 neonatos (segundo dia pós-natal; P2), que foram isolados e transferidos para solução HBSS gelada e as meninges foram cuidadosamente removidas. Os tecidos foram então partidos em pedaços de aproximadamente 1 mm, triturados, filtrados em peneira de 100 µm e coletados por centrifugação a 1.200 x g por 5 minutos. O precipitado de células foi dissociado com uma pipeta, suspenso em meio DMEM (baixa concentração de glicose, contendo

10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina e 1% de anfotericina B) e filtrado em tela de 10 µm, e o volume do filtrado foi ajustado para 25 mL. Adicionou-se 5 mL de meio DMEM em frascos T75 para cultura de células e 5 mL do preparado celular, totalizando 10 mL por frasco, os quais foram mantidos em 37°C e 5% CO₂. As culturas foram mantidas por cerca de 4 semanas, substituindo-se o meio DMEM por um novo uma vez por semana. Após atingirem confluência (10 – 12 dias), as células foram agitadas e depositadas em placas de 6 poços em densidade de $2,5 \times 10^5$ células/mL. Os astrócitos formam uma camada confluenta em 2 a 3 dias após o depósito em placa. Antes dos experimentos, 0,15 mM cAMP (Sigma-Aldrich Corporation, MO, EUA) foi adicionado aos poços para induzir diferenciação das células.

Para análise da liberação de MCP-1, o meio de cultura das placas foi substituído por meio OptiMEM, contendo 1% de penicilina/estreptomicina, ao qual foi adicionado LXA4 (1, 10 ou 100 nM) durante 30 minutos, antes da estimulação das células com TNF-α (20 ng/mL) por 3 horas. Os níveis de MCP-1 foram determinados utilizando-se kit específico de ELISA (enzyme immuno sorbent assay, R & D Systems, MN, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Os resultados são expressos em pg/mL.

3.3.11. Drogas, reagentes e soluções

Os seguintes reagentes, drogas e soluções foram utilizados:

- Cloridrato de Cetamina (Dopalen[®], Sespo Indústria e Comércio Ltda, SP, Brasil);
- Xilazina (Dopaser[®], Laboratórios Calier S.A., Barcelona,

Espanha);

- Cloridrato de lidocaína (Xylestesin[®], Cristália, SP, Brasil);
- Isoflurano (Forene, Abbott, IL, EUA);
- Deoxinucleotídeos (dNTPs) (Invitrogen, São Paulo, Brasil);
- Dietiltreitol (DTT) (Invitrogen, São Paulo, Brasil);
- Enzima transcriptase reversa (Invitrogen, São Paulo, Brasil).
- Inibidor de RNase (RNasin) (Invitrogen, São Paulo, Brasil);
- Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) (Invitrogen, São Paulo, Brasil);
- Master Mix TaqMan[®] Universal PCR (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil);
- oligo dT 15 (Invitrogen, São Paulo, Brasil);
- Salina tamponada com fosfato em tabletes (phosphate-buffered saline – PBS, Sigma, St. Louis, MO, EUA);
- Tampão de primeira fita para a reação de transcrição reversa (Invitrogen, São Paulo, Brasil)
- LXA4 (Cayman Chemical Company, MI, EUA)
- Trizol[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA)
- ALX/FPR2 siRNA (FPR2 *Trilencer-27 Mouse siRNA*, Origene, MD, EUA);
- Scrambled siRNA (*Trilencer-27 Universal Scrambled Negative Control siRNA*, Origene, MD, EUA);
- Polietileneimina (PEI, MBI Fermentas, MD, EUA);
- SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen, CA, EUA);
- Padrão EasyLadder I (Bioline, MA, EUA);
- Anticorpo primário anti-IBA1 (coelho, Wako Pure Chemical Industries, EUA);
- Anticorpo primário anti-GFAP (camundongo, Millipore Bioscience Research Reagents, Darmstadt, Alemanha);
- Anticorpo primário anti-p-p38 (Millipore Bioscience Research Reagents, Darmstadt, Alemanha);
- Anticorpo primário anti-GAPDH (Millipore Bioscience Research Reagents, Darmstadt, Alemanha);
- Anticorpo primário anti-ALX/FPR2 (Coelho, Novus Biologicals, CO, EUA);
- Anticorpo secundário anti-coelho conjugado com Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Reino Unido);
- Anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Reino Unido);

- DAPI - 4', 6'-diamidino-2-fenilindol (Sigma-Aldrich Corporation, MO, EUA);
- Solução balanceada de Hanks (*Hanks balanced salt solution*, HBSS – Life Technologies, MA, EUA);
- Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM – Life Technologies, MA, EUA);
- Meio OptiMEM (Life Technologies, MA, EUA);
- Tampão de lise RIPA (*RIPA Lysis and extraction buffer*, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA);
- Soro de cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Reino Unido);
- Albumina bovina (Sigma-Aldrich Corporation, MO, EUA);
- Triton X100 (Sigma-Aldrich Corporation, MO, EUA);
- cAMP (Sigma-Aldrich Corporation, MO, EUA)

A lipoxina A4 foi preparada em etanol 0.5% em solução salina tamponada com fosfato 0,01 M, pH 7,2 a 7,4 –PBS.

3.3.12. Análise de resultados

Os resultados são apresentados como a média \pm erro padrão da média (e.p.m) ou como mediana \pm interquartis, conforme cada caso. As porcentagens de inibição ou de aumento de expressão de proteínas ou RNAm são expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m) das inibições ou dos aumentos máximos individuais obtidos em cada experimento. A significância estatística das diferenças entre os grupos foi avaliada através da análise do teste de Kruskal-Wallis, teste “t” de Student ou da análise de variância (ANOVA de uma via ou ANOVA de duas vias com medidas repetidas), seguida do teste *post hoc* de Bonferroni, conforme as características de cada situação. Diferenças entre grupos com valor de $P < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes. Todas as comparações estatísticas foram efetuadas

utilizando o programa GraphPad 5[®] (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Resultados obtidos com experimentos realizados em ratos

4.1.1. Avaliação da atividade locomotora após a lesão medular

A fim de reproduzir o modelo experimental de hemissecção da medula espinhal em ratos, avaliamos a performance locomotora dos animais através da escala de atividade locomotora BBB, desenvolvida por Basso e colaboradores (1995). Durante o período de avaliação de 28 dias, os animais falso-operados apresentaram atividade locomotora normal (escore 21 pontos), a qual é caracterizada por passada plantar consistente e marcha coordenada, liberação consistente dos dedos, a posição predominante da pata é paralela ao corpo durante toda a fase de apoio, estabilidade consistente do tronco e a cauda consistentemente elevada. Por outro lado, a hemissecção da medula espinhal levou a déficit locomotor da pata esquerda (ipsilateral à lesão) no segundo dia após a cirurgia, sendo que a recuperação funcional se acentuou gradualmente ao longo dos 28 dias de observação. Dessa forma, no 28º dia o escore BBB dos animais lesados apresentou mediana de 18 pontos, o qual pode ser descrito por passada plantar consistente, coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha, liberação dos dedos ocorre frequentemente durante o movimento do membro para a frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada no instante da liberação, em conformidade com os resultados obtidos por Christensen e colaboradores (1996) (Figura 6).

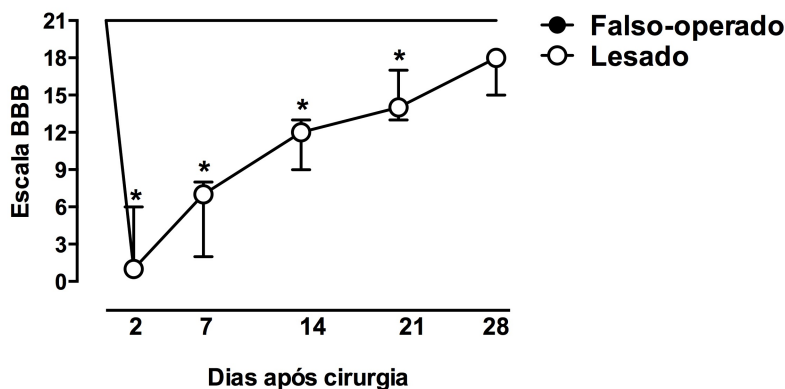
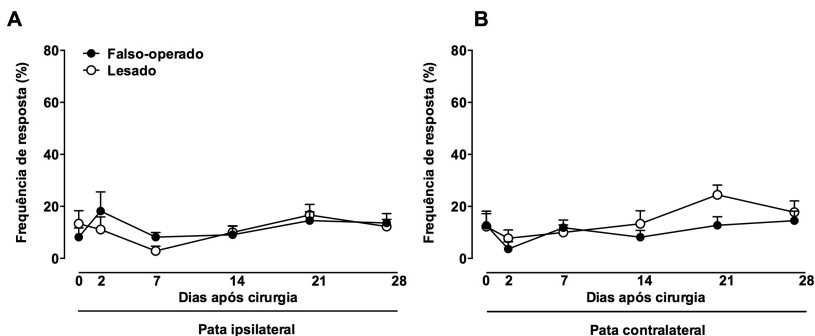


Figura 6. Avaliação da escala BBB de atividade locomotora em animais submetidos à hemisseção da medula espinhal. Cada grupo representa a mediana e o intervalo interquartil de 7 - 8 animais. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo falso-operado. Os asteriscos (*) denotam $P < 0,05$ quando comparado ao grupo falso-operado (Mann-Whitney U test).

4.1.2. Alteração da sensibilidade mecânica em decorrência da lesão medular

Com o objetivo de caracterizar a presença de dor após a lesão da medula espinhal, avaliamos o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica, tanto em membros anteriores quanto posteriores, nos períodos de 2, 7, 14, 21 e 28 dias após o a lesão medular, utilizando para tal filamentos de von Frey de 4 e 15 gramas (Detloff *et al.*, 2010; Detloff *et al.*, 2012). Observamos que os animais submetidos a lesão medular não apresentaram frequências de resposta aumentadas ao estímulo mecânico nos membros anteriores com nenhum dos filamentos utilizados em qualquer dos momentos analisados, sugerindo ausência de hiperalgesia acima do nível da lesão medular (figura 7).

Filamento 4 gramas



Filamento 15 gramas

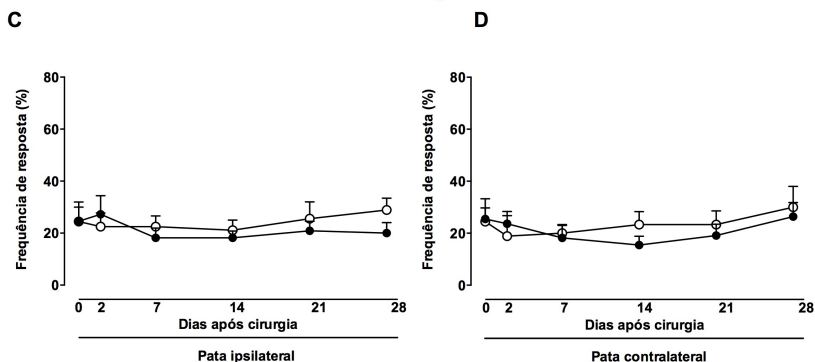


Figura 7. Avaliação dos efeitos da hemisseção medular em T_{10} sobre a sensibilidade mecânica frente ao estímulo das patas anteriores com filamentos de Von Frey. Resposta de frequência de retirada (%) das patas anteriores após 10 estímulos por filamento de von Frey de 4 (A e B) e 15 g (C e D), avaliados em 2, 7, 14, 21 e 28 dias após o procedimento cirúrgico. Cada grupo representa a média \pm e.p.m. de 6 - 8 animais (ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni).

No entanto, quando comparados aos animais falso-operados, os animais lesados apresentaram aumento significativo da resposta ao estímulo mecânico em ambas as patas posteriores (4 gramas, pata ipsilateral: aumentos de $212,5 \pm 71,8 \%$, $151,7 \pm 39,8 \%$ e $162,5 \pm$

18,3 %, em 14, 21 e 28 dias, respectivamente; 4 gramas, pata contralateral: $168,5 \pm 25,2$ %, $200,0 \pm 53,4$ %, $120,0 \pm 26,9$ % e $128,75 \pm 58,4$ %, nos dias 7, 14, 21 e 28, respectivamente; filamento de 15 g, pata ipsilateral: $168,5 \pm 52,5$ %, $170,5 \pm 56,2$ %, $139,6 \pm 47,0$ % e $131,5 \pm 35,2$ % em 7, 14, 21 e 28 dias, respectivamente; filamento 15 g, pata contralateral: $173,6 \pm 53,8$ %, $212,1 \pm 82,9$ %, $244,4 \pm 85,2$ % e $357,8 \pm 102,7$ %, nos mesmos períodos, respectivamente). Também foi observada redução acentuada da resposta no período de 2 dias, consequência do choque medular característico do período, o qual corresponde ao bloqueio transitório das funções e reflexos abaixo do nível da lesão (figura 8).

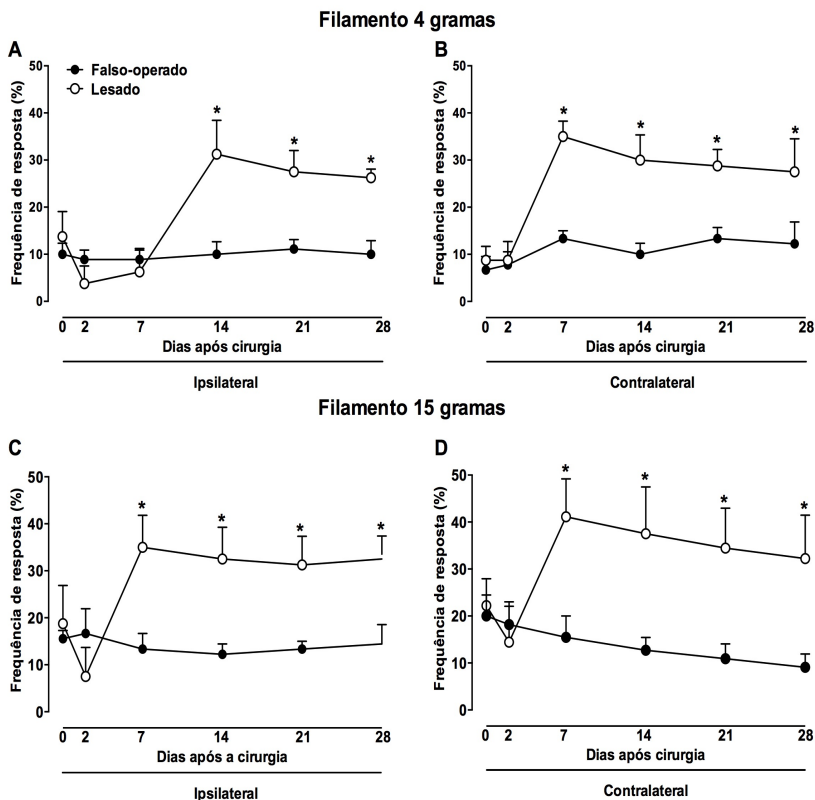


Figura 8. Avaliação dos efeitos da hemissecção medular em T_{10} sobre a sensibilidade mecânica frente ao estímulo das patas posteriores com filamentos de Von Frey. Resposta de frequência de retirada (%) das patas posteriores ipsi e contralateral após 10 estímulos por filamento de von Frey de 4 (A e B) e 15 g (C e D), avaliados em 2, 7, 14, 21 e 28 dias após o procedimento cirúrgico. Cada grupo representa a média \pm e.p.m. de 6 - 8 animais. Os asteriscos (*) denotam $P < 0,05$ em comparação ao grupo falso-operado (ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni).

4.1.3. Avaliação do teor de lipoxina A4 na medula espinhal

Buscando identificar se a LXA4 era expressa na medula espinhal e se haveria alguma alteração em sua formação após a lesão medular, realizamos a quantificação dos seus níveis na medula. Dessa forma, podemos observar na figura 9 o aumento significativo dos níveis de LXA4 na medula espinhal nos períodos agudos após a lesão, em comparação aos animais falso-operados ($317,2 \pm 78,5\%$ e $191,3 \pm 5,2\%$, em 2 e 4 dias respectivamente).

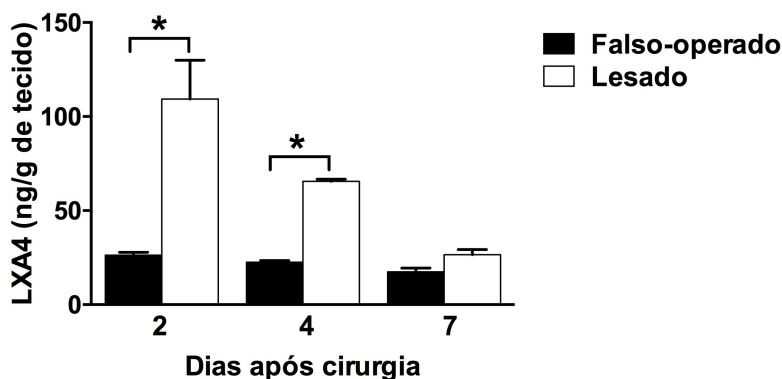


Figura 9. Dosagem de LXA4 na medula espinhal de animais submetidos ou não à lesão medular. A medula espinhal de animais falso-operados ou lesados foi coletada em 2, 4 ou 7 dias após o procedimento cirúrgico e submetida à extração da LXA4 para sua dosagem por ELISA. Cada barra representa média \pm e.p.m de 4 animais. Os asteriscos (*) denotam $P < 0,05$ em comparação ao grupo falso-operado (ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni).

4.1.4. Análise dos níveis de RNAm para o receptor ALX/FPR2 após a lesão medular

Tendo avaliado os níveis endógenos de LXA4 na medula espinhal, determinamos a expressão dos níveis de RNAm para o receptor ALX/FPR2 tanto na medula espinhal quanto no GRD para investigar os efeitos da lesão medular sobre sua expressão.

Na figura 10, observamos na medula espinhal um aumento significativo nos níveis de RNAm em todos os períodos avaliados após a lesão (17 vezes, 3,5 vezes e 8 vezes em 2, 4 e 7 dias, respectivamente). No entanto, não foi possível detectar qualquer expressão de RNAm para o ALX/FPR2 no GRD.

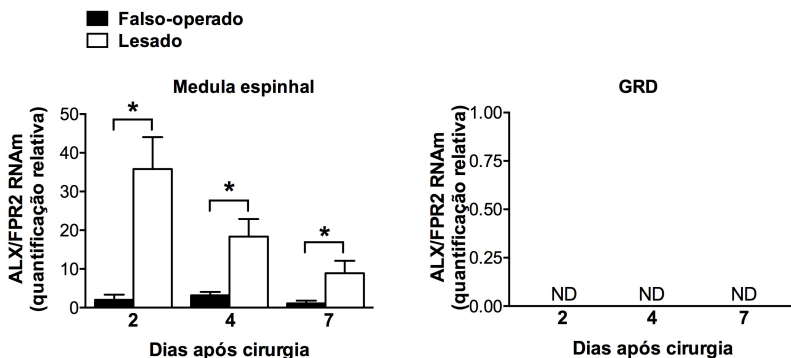


Figura 10. Efeito da lesão medular sobre os níveis de RNAm para o receptor ALX/FPR2 na medula espinhal e gânglio da raiz dorsal. Níveis de RNAm para o receptor ALX/FPR2 na medula espinhal (medula) e no gânglio da raiz dorsal (GRD) coletados 2, 7 e 14, 21 e 28 dias após o procedimento cirúrgico. Cada barra representa a média \pm e.p.m. de 4 animais. Os asteriscos (*) denotam $P < 0,05$ em comparação ao grupo falso-operado (ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni).

4.1.5.Efeito da administração intratecal de lipoxina A4 sobre a sensibilidade das patas posteriores frente ao estímulo mecânico após a lesão medular

Considerando-se os resultados obtidos até o momento, em que determinamos a presença de sensibilidade mecânica aumentada já no sétimo dia após a lesão, bem como de redução dos níveis de LXA4 após o quarto dia pós-operatório, realizamos a administração intratecal de LXA4 em 4 e 24 horas após a cirurgia. Ao administrarmos LXA4 (300 pmol), observamos uma redução significativa na hiperalgesia mecânica da pata ipsilateral a partir do 7º até o 28º dia (de $69,7 \pm 14,4\%$, $91,2 \pm 8,6\%$, $76,4 \pm 9,4\%$ e $91,4 \pm 5,5\%$, em 7, 14, 21 e 28 dias, respectivamente) e na pata contralateral apenas em 7 e 14 dias após a lesão ($69,1 \pm 9,2\%$ e $75,7 \pm 9,7\%$, respectivamente; figura 11). Porém, efeito similar não foi observado quando administramos 150 pmol de LXA4, a qual foi capaz de reduzir significativamente apenas a resposta da pata ipsilateral em 14, 21 e 28 dias ($47,6 \pm 17,1\%$, $55,6 \pm 21,3\%$ e $44,5 \pm 14,3\%$, respectivamente). Dessa forma, utilizamos a dose de 300 pmol de LXA4 nos experimentos subsequentes.

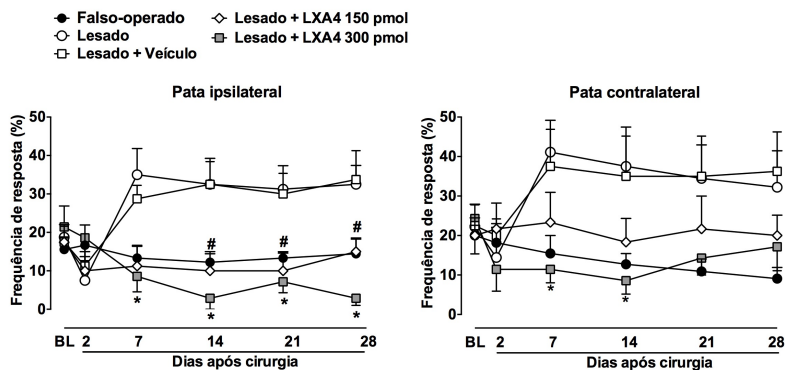


Figura 11. Efeito do tratamento com lipoxina A4 sobre a hiperalgesia mecânica das patas posteriores induzida por lesão medular. Frequência de resposta (%) das patas posteriores a 10 estímulos por filamento de von Frey de 15 g, após o tratamento com LXA4 (150 ou 300 pmol) ou veículo. Cada grupo representa a média \pm e.p.m. de 6 - 8 animais. Os asteriscos (*) e cerquilhas (#) denotam $P < 0,05$ na comparação entre os grupos lesado + 300 pmol e veículo e lesado + 150 pmol e veículo, respectivamente (ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni).

4.1.6. Efeito da administração intratecal de lipoxina A4 sobre a atividade locomotora após a lesão medular

Conforme ilustrado na figura 12, no transcorrer das semanas de recuperação ocorre uma recuperação espontânea e parcial dos movimentos da pata ipsilateral à lesão medular, de maneira que os animais lesados tratados com veículo atingem um escore médio de 15 pontos no 28º dia, o qual é caracterizado por passada plantar consistente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e nenhuma liberação dos dedos ou liberação ocasional durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata paralela ao corpo no instante do contato inicial. De maneira interessante, observamos que o tratamento com LXA4 na dose de 300 pmol foi capaz de acentuar de

maneira significativa a restauração dos movimentos locomotores. O efeito positivo do tratamento teve início já no 7º dia pós-operatório e estendeu-se até o 21º do período de observação, quando a mediana do escore BBB deste grupo de animais foi de 18,5 pontos e o do grupo tratado com veículo foi de 15 pontos. Por outro lado, a administração de uma dose menor de LX4, 150 pmol, acentuou a recuperação locomotora dos animais apenas no 7º dia, período em que os animais apresentaram mediana de 12,5 pontos, significativamente abaixo do escore observado no grupo veículo (7 pontos) ou LX4 300 pmol (14 pontos).

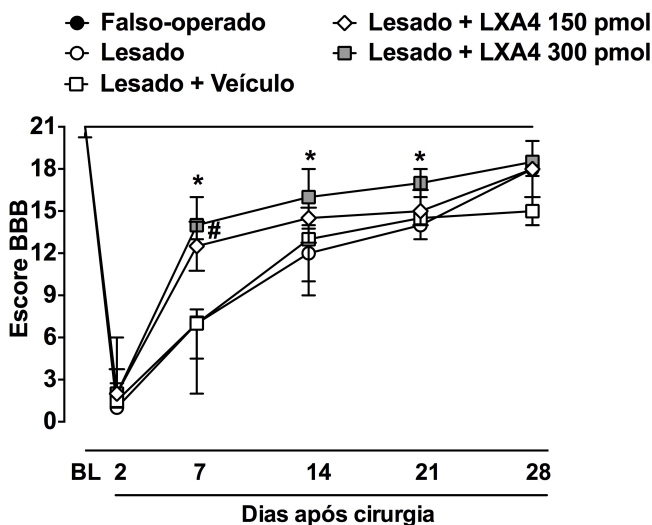


Figura 12. Avaliação do efeito do tratamento com LX44 sobre a atividade locomotora de animais submetidos à hemissecção medular. Os animais receberam duas injeções intratecais de LX44 150 pmol, LX44 300 pmol ou veículo, em 4 e 24 horas após a hemissecção da medula espinhal. A avaliação da atividade locomotora foi realizada durante 28 dias através da escala de atividade locomotora BBB. Cada grupo representa a mediana e o intervalo interquartil de 6 animais. Os asteriscos (*) e cerquilhas (#) denotam $P < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com veículo (Teste de Kruskal-Wallis).

4.1.7. Avaliação da liberação de citocinas após a lesão medular e o tratamento com LXA4

Visando investigar o estabelecimento do processo inflamatório decorrente da lesão medular e as ações da LXA4 sobre a liberação de citocinas, analisamos os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α , além da citocina antiinflamatória IL-10, na medula espinhal de animais submetidos ao traumatismo medular e tratamento com LXA4. Conforme ilustra a Figura 13, a lesão medular aumentou significativamente os níveis da citocina IL-1 β em 4 ($259,0 \pm 94,4\%$) e 7 dias após o procedimento cirúrgico ($444,0 \pm 60,1\%$), sendo que o tratamento com lipoxina A4 reduziu significativamente os níveis desta citocina apenas no 7º dia após a lesão ($65,5 \pm 13,5\%$; A) em comparação aos níveis encontrados nos animais tratados com veículo. Os níveis da citocina IL-6 foram significativamente aumentados em 2 e 7 dias após a lesão medular ($117,6 \pm 34,0\%$ e $186,9 \pm 2,1\%$, respectivamente), os quais foram reduzidos de maneira significativa pelo tratamento com LXA4 ($62,5 \pm 9,5\%$ e $38,3 \pm 16,2\%$; B). Já a liberação de TNF- α foi aumentada pela lesão medular em todos os períodos avaliados ($407,5 \pm 78,9\%$, $543,5 \pm 28,3\%$ e $568 \pm 46,0\%$ em 2, 4 e 7 dias, respectivamente), sendo que o tratamento com LXA4 reduziu de maneira significativa esse aumento em todos os períodos avaliados ($36,0 \pm 1,0\%$, $51,3 \pm 11,7\%$ e $55,5 \pm 18,5\%$, respectivamente; C). Já a citocina antiinflamatória IL-10 teve seus níveis significativamente aumentados pelo tratamento com LXA4, em 2 e 4 dias após a indução da lesão medular, em comparação aos animais que receberam o tratamento com veículo ($98,3 \pm 11,8\%$ e $92,3 \pm 10,5\%$; D).

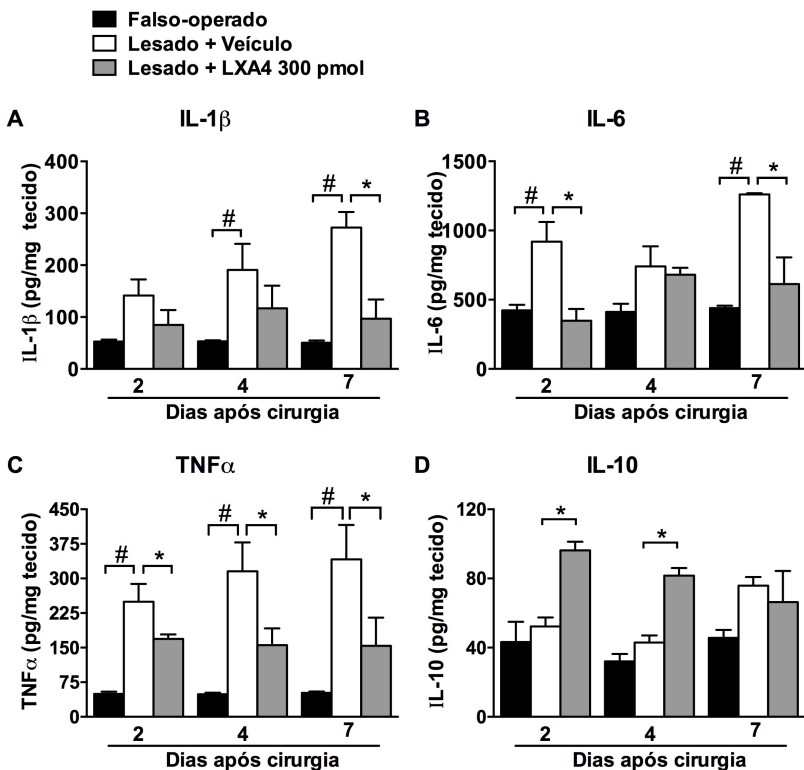


Figura 13. Efeito da lesão medular e do tratamento com lipoxina A4 nos níveis de IL-1 β , IL-6, TNF α e IL-10. Determinação dos níveis de IL-1 β (A), IL-6 (B), TNF α (C) e IL-10 (D) na medula espinhal de animais falso-operados ou lesados após o tratamento com lipoxina A4 300 pmol. Cada barra representa a média \pm e.p.m. de 4 animais. Os asteriscos (*) e cerquilhas (#) denotam $P < 0,05$ em comparação ao grupo lesado tratado com veículo (ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni).

4.2 Resultados obtidos com experimentos realizados em camundongos

4.2.1. Avaliação da sensibilidade mecânica induzida pela lesão medular após o tratamento com lipoxina A4

Com o objetivo de verificar se a LXA4 teria, em camundongos, o mesmo efeito observado em ratos em reduzir a hiperalgesia mecânica, os camundongos também receberam duas injeções intratecais de LXA4 em 4 e 24 horas após a lesão. Porém realizamos algumas alterações de protocolo para a análise comportamental em resposta à estímulos com filamentos de von Frey.

Como podemos observar na figura 14, os animais lesados apresentaram hipersensibilidade mecânica da pata ipsilateral a partir do 14º dia ($59,4 \pm 41\%$, $66,6 \pm 4,6\%$, $56,8 \pm 7,7\%$ e $49,0 \pm 10,1\%$ nos dias 14, 21, 28 e 35, respectivamente) e na contralateral já a partir do 7º dia ($74,0 \pm 1,5\%$, $81,6 \pm 3,4\%$, $83,8 \pm 1,3\%$, $82,6 \pm 8,3\%$ e $85,0 \pm 4,9\%$ nos dias 7, 14, 21, 28 e 35, respectivamente), em comparação aos animais falso-operados, perdurando pelos 35 dias de avaliação. O tratamento com LXA4, em 4 e 24 horas após a cirurgia, aumentou o limiar de retirada da pata ipsilateral dos animais a partir do 14º até o 35º dia ($98,0 \pm 57,5\%$, $130,8 \pm 72,7\%$, $74,6 \pm 20,4\%$ e $88,4 \pm 45,4\%$). Após a nova administração intratecal de LXA4, foi possível observar diferença significativa em 1, 3 e 24 horas, em comparação ao grupo de animais tratados com veículo ($260,2 \pm 1,6\%$, $160,8 \pm 91,6\%$ e $118,0 \pm 40,5\%$).

Com relação à pata contralateral, o tratamento inicial com LXA4 (em 4 e 24 horas) alterou significativamente a resposta dos animais em todos os períodos avaliados ($220,8 \pm 55,5\%$, $302,0 \pm 73,0\%$, $322,0 \pm 9,2\%$, $171,6 \pm 68,1\%$ e $268,0 \pm 32,0\%$ em 7, 14, 21, 28 e 35 dias

respectivamente). Por outro lado, a nova administração de LXA4 no 35º dia reduziu significativamente a resposta dos animais nos períodos avaliados, com exceção da avaliação feita 1 hora após a injeção, em comparação aos animais tratados com veículo ($828,0 \pm 10,8\%$, $365,0 \pm 10,8\%$ e $582,5 \pm 10,3\%$ em 3, 6 e 24 horas).

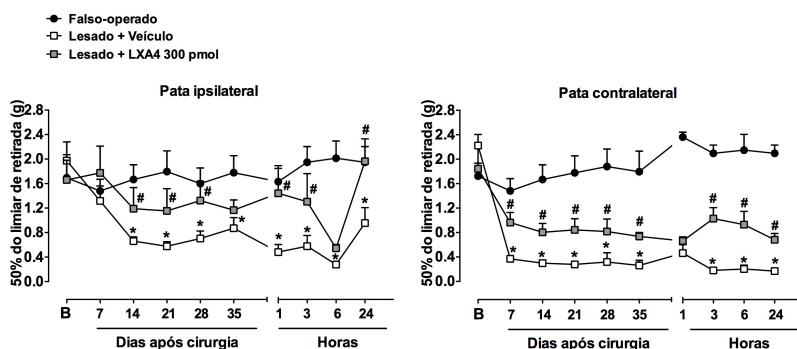


Figura 14. Efeito do tratamento com lipoxina A4 sobre a hiperalgesia mecânica das patas posteriores induzida por lesão medular. Limiar de retirada (g) a sucessivas aplicações por filamento de von Frey após o tratamento com LXA4 (300 pmol) ou veículo, em 4 e 24 horas após a cirurgia, e no 35º dia. Cada grupo representa a média \pm e.p.m. de 6 animais. Os asteriscos (*) denotam $P < 0,05$ em comparação ao grupo falso-operado e as cerquilhas (#) denotam $P < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com veículo (ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni).

4.2.2. Ação da lipoxina A4 na dor neuropática através do receptor ALX/FPR2

Para elucidação da participação do receptor ALX/FPR2 nas respostas induzidas pela lipoxina A4, realizamos o silenciamento gênico com siRNA do receptor. Como observado anteriormente, a lesão medular não alterou a resposta da pata ipsilateral de camundongos no 7º dia após a lesão, mas houve aumento da sensibilidade mecânica na pata

contralateral neste período (figura 14). Podemos observar na figura 15 que o efeito da LXA4 em reduzir a sensibilidade da pata contralateral dos animais no sétimo dia após a lesão deixa de estar presente quando é feito o silenciamento do receptor ALX/FPR2.

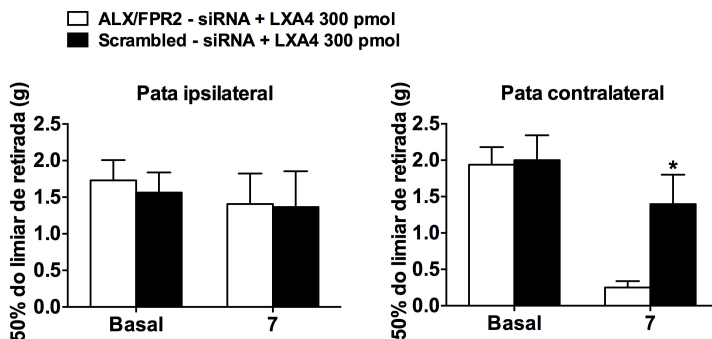


Figura 15. Efeito do silenciamento do receptor ALX/FPR2 na ação da lipoxina A4. Limiar de retirada (g) a sucessivas aplicações por filamento de von Frey após o tratamento com ALX/FPR2 siRNA e LXA4 (300 pmol). Cada barra representa a média \pm e.p.m. de 6 animais. Os asteriscos (*) denotam $P < 0,05$ em comparação ao grupo controle (Teste t de Student).

4.2.3. Análise dos níveis de RNAm para diferentes marcadores neuroinflamatórios na medula espinal após a lesão medular

Diversos estudos realizam investigações moleculares relativas à neuroinflamação nos segmentos lombares da medula espinal, por se tratar da região de inervação proveniente das patas posteriores. Dessa forma, avaliamos os dois principais marcadores de nosso interesse nesse estudo primeiramente nessa região, a fim de avaliar a diferença na expressão quando comparada à região do sítio da lesão medular. A figura 16 ilustra que há uma diferença significativa na expressão do RNAm de Iba-1, marcador de microglia, na medula espinal de animais lesados em comparação aos animais falso-operados. Entretanto, o

aumento no segmento torácico é de $384,3 \pm 74,8\%$ enquanto no segmento lombar é de $71,7 \pm 13,2\%$, não havendo diferença estatística quando a comparação é feita apenas entre os grupos de animais lesados. Já em relação ao marcador de astrócitos GFAP, observamos aumento significativo nos animais lesados no segmento torácico ($346,2 \pm 50,6\%$), o qual não acontece no segmento lombar. Dessa forma, todos os nossos estudos subsequentes foram realizados no segmento torácico, área da hemisseção da medula espinhal.

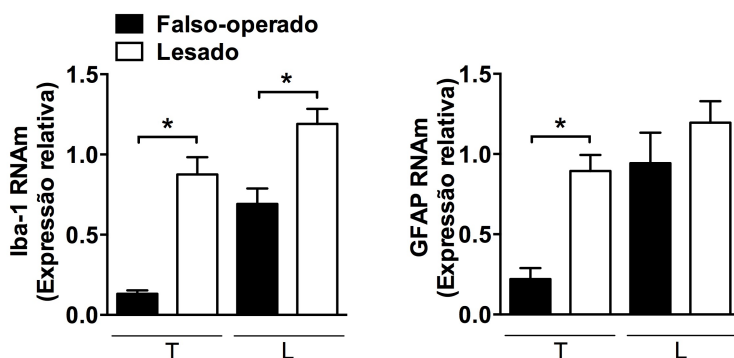


Figura 16. Análise comparativa da expressão de marcadores celulares entre os segmentos lombar e torácico da medula espinhal. Níveis de RNAm para os marcadores Iba-1 e GFAP nos segmentos torácico (T) e lombar (L) da medula espinhal 7 dias após o procedimento cirúrgico. Cada barra representa a média \pm e.p.m. de 4 animais. Os asteriscos (*) denotam $P < 0,05$ em comparação ao grupo falso-operado (Teste t de Student).

Avaliamos, na sequência, a presença do RNAm para diferentes marcadores neuroinflamatórios na medula espinhal torácica de animais falso-operados e lesados com e sem tratamento no 7º dia após a lesão medular. Dessa forma, como demonstrado na figura 17, a lesão medular levou ao aumento significativo do RNAm do receptor ALX/FPR2 ($128,0 \pm 73,1\%$), dos marcadores GFAP (17 vezes) e Iba-1 ($351,5 \pm$

5,7%) e também do TNF- α ($285,0 \pm 69,4\%$), em comparação aos animais falso-operados. A administração da LXA4 reduziu a expressão de RNAm para Iba-1 (em $48,8 \pm 8,1\%$) e para TNF- α (em $60,5 \pm 13,9\%$), mas não modificou as dos RNAm para ALX/FPR2 ou GFAP.

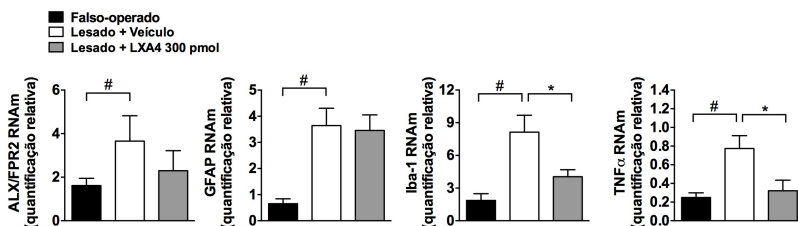


Figura 17. Efeito da LXA4 sobre a expressão do RNAm de marcadores neuroinflamatórios na medula espinhal. Níveis de RNAm para os marcadores ALX/FPR2, GFAP, Iba-1 e TNF- α no segmento torácico da medula espinhal 7 dias após o procedimento cirúrgico, em animais tratados ou não com lipoxina A4 (300 pmol). Cada barra representa a média \pm e.p.m. de 4 animais. As cerquilhas (#) denotam $P < 0,05$ em comparação ao grupo falso-operado e os asteriscos (*) denotam $P < 0.05$ em comparação ao grupo veículo (Teste t de Student).

4.2.4. Lipoxina A4 reduz ativação celular na medula espinhal após a lesão medular

Avaliamos a capacidade da LXA4 em reduzir a ativação de astrócitos e microglias na medula espinhal após a lesão medular, através de ensaio de imunofluorescência em 7 e 35 dias após o procedimento cirúrgico. A figura 18 demonstra que a lesão medular levou ao aumento significativo de Iba-1 e GFAP ($231,5 \pm 22,1\%$ e $82,6 \pm 30,9\%$, respectivamente) no 7º dia após o procedimento cirúrgico. No entanto, o tratamento com LXA4 reduziu significativamente apenas os níveis do marcador de microglia Iba-1 ($36,7 \pm 1,3\%$).

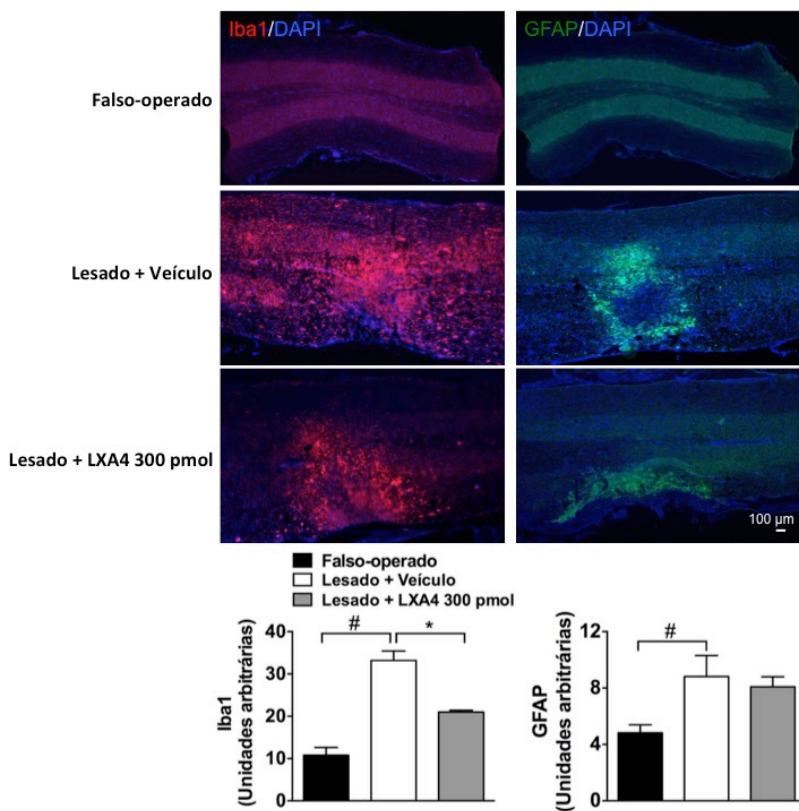


Figura 18. Expressão dos marcadores celulares Iba-1 e GFAP na medula espinhal no sétimo dia após o trauma medular. Imagens representativas de imunomarcção dos marcadores celulares Iba-1 (vermelho) e GFAP (verde), co-localizados com o marcador nuclear DAPI (azul), na medula espinhal de animais falso-operados e lesados tratados com veículo ou LXA4 300 pmol, 7 dias após a hemisseção medular (escala = 100 μm). Cada barra representa a média ± e.p.m. de 4 animais. As cerquilhas (#) denotam $P < 0,05$ em comparação ao grupo falso-operado e os asteriscos (*) denotam $P < 0,05$ em comparação ao grupo veículo (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

Perfil semelhante de resposta pode ser observado 35 dias após a lesão medular. Há um aumento significativo de Iba-1 e GFAP nos animais lesados ($239,8 \pm 16,5\%$ e $171,4 \pm 43,2\%$, respectivamente), no entanto, o tratamento com LXA4 reduziu significativamente apenas os níveis do marcador de microglia Iba-1 ($27,0 \pm 9,4\%$; Figura 19).

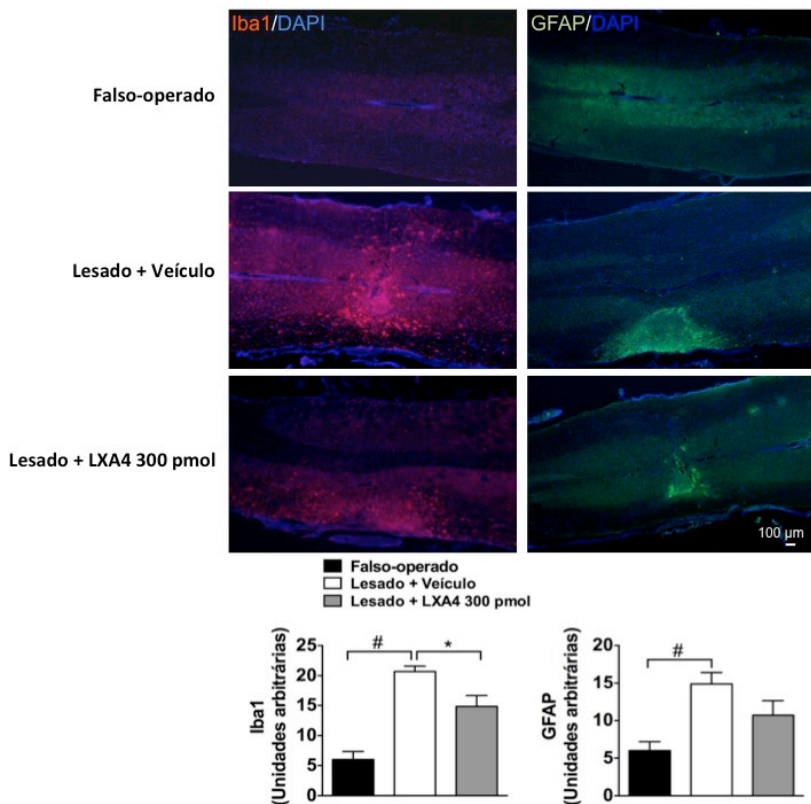


Figura 19. Expressão dos marcadores celulares Iba-1 e GFAP na medula espinhal no 35º dia após o trauma medular. Imagens representativas de imunomarcação dos marcadores celulares Iba-1 (vermelho) e GFAP (verde), co-localizados com o marcador nuclear DAPI (azul), na medula espinhal de animais falso-operados e lesados tratados com veículo ou LXA4 300 pmol, 35 dias após a hemiseccção medular (escala = 100 μ m). Cada barra representa a média \pm e.p.m. de 4 animais. As cerquilhas (#) denotam $P < 0,05$ em comparação ao grupo falso-operado e os asteriscos (*) denotam $P < 0,05$ em comparação ao grupo veículo (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.2.5. Ações da LXA em cultura de microglia

Levando em consideração as informações acerca da participação das células da microglia e astrócitos no processo neuroinflamatório e no desenvolvimento da dor, avaliamos os efeitos da LXA4 sobre estas células, buscando uma possível explicação para a redução da dor ocasionada pelo tratamento com esse lipídeo. Ao estimular com IFN- γ 20 ng/mL as células da microglia, observamos um aumento significativo na liberação de TNF- α (13 vezes), o qual foi reduzido significativamente pelo tratamento com LXA4 nas duas concentrações utilizadas ($84,9 \pm 6,9\%$ e $90,6 \pm 0,1\%$ em resposta a 10 e 100 nM de LXA4; figura 20).

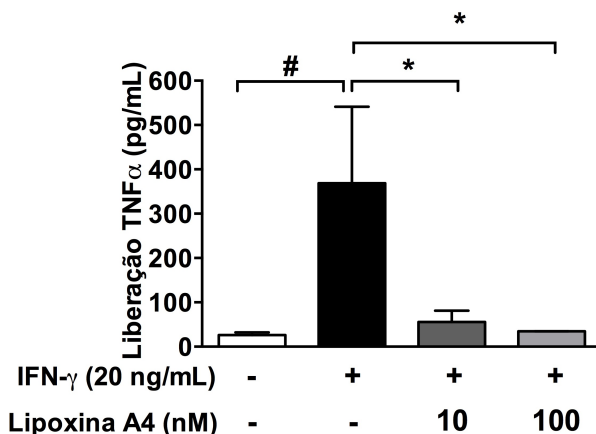


Figura 20. Redução da liberação de TNF- α de culturas de células da microglia do córtex cerebral após tratamento com LXA4. Cada barra representa a média \pm e.p.m. de 4 grupos. Os asteriscos (*) denotam $P < 0,05$ em comparação ao grupo estimulado apenas com IFN- γ e as cerquilhas (#) denotam $P < 0,05$ em comparação ao grupo controle (ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni).

Além disso, também realizamos ensaio para avaliar a ativação da proteína MAPK p38 pelo IFN- γ (aumento na expressão de $126,5 \pm$

13,8%) e observamos a redução da proteína após a incubação com LXA4 ($58,5 \pm 14,6\%$; figura 21).

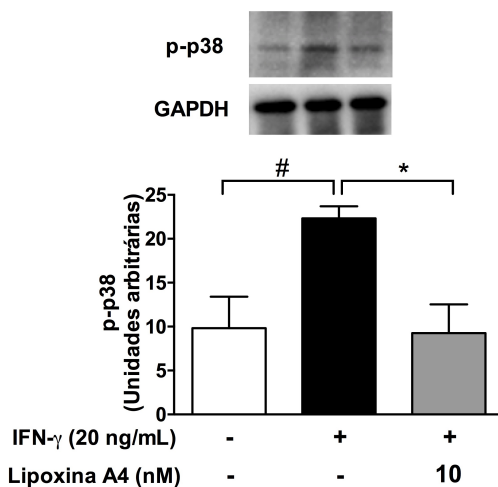


Figura 21. Redução da ativação da proteína p38 MAPK em cultura de células da microglia de córtex cerebral após tratamento com LXA4. Cada barra representa a média \pm e.p.m. de 4 grupos. Os asteriscos (*) denotam $P < 0,05$ em comparação ao grupo controle (teste t de Student).

4.2.6. Ações da LXA4 em cultura de astrócitos

Por outro lado, quando as culturas de astrócitos estimuladas com TNF- α foram tratadas com LXA4 não observamos qualquer alteração na liberação da quimiocina MCP-1 (figura 22).

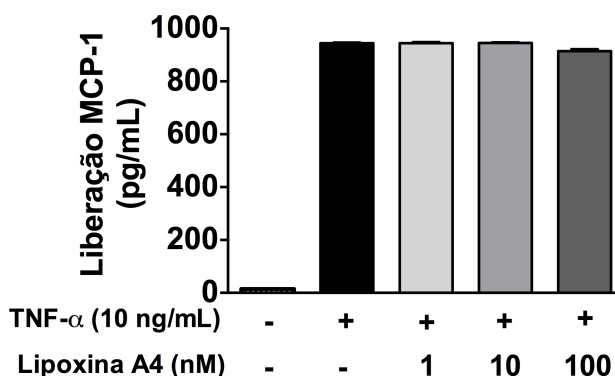


Figura 22. Efeito do tratamento de culturas de astrócitos com LXA4 na liberação de MCP-1. Cada barra representa a média \pm e.p.m. de 4 grupos.

4.2.7. Expressão do receptor ALX/FPR2 em células da microglia

A fim de explicar os efeitos da LXA4 observados nas culturas de microglia de córtex cerebral, avaliamos a expressão do receptor ALX/FPR2 nestas células e também em astrócitos. Até o presente momento não há relatos da expressão do receptor em células de microglia no SNC. Entretanto, detectamos o RNAm do receptor nestas células através da eletroforese em gel de agarose (figura 23). Como confirmação, procedemos à técnica de imunofluorescência e pudemos confirmar a presença do receptor em culturas de células de microglia (figura 23, A - C).

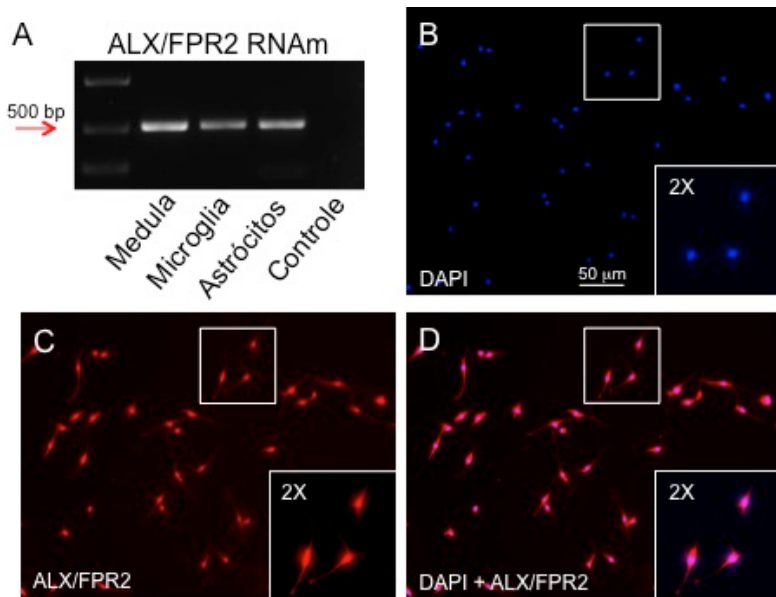


Figura 23. Expressão do receptor ALX/FPR2 e do RNAm em culturas de microglia, astrócitos e na medula espinhal. A, imagem representativa de eletroforese em gel de agarose demonstrando a expressão do mRNA do receptor ALX/FPR2 em medula espinhal, microglia ou astrócitos. C – D, fotomicrografias de células da microglia marcadas com DAPI (marcador nuclear, B) ALX/FPR2 (C) ou ambos (D).

5. DISCUSSÃO

“Se ocorre sofrimento quando há alguma ameaça à integridade do indivíduo ou perda de parte dele, o sofrimento continuará se a pessoa não conseguir se tornar íntegra outra vez”, escreve Eric J. Cassell em seu livro *The Nature of Suffering and the Goals of Medicine* (sem tradução para o português). Nesse sentido, a dor crônica torna-se um desafio por representar uma ameaça constante, prolongada, que abrange todos os aspectos da vida do indivíduo e não tem solução direta.

A lesão medular traumática é uma condição severa integrada por diversas consequências incapacitantes. Embora a perda de função e movimento dos membros seja considerada um problema primordial, a presença de dor geralmente constitui uma consequência grave e diretamente relacionada à perda de qualidade de vida do indivíduo cadeirante. Enquanto nossa experiência diária com a inflamação aguda ressalta a associação entre dor e inflamação, foi apenas na última década que os estudos passaram a relacionar a neuroinflamação presente após uma lesão na medula espinhal à dor duradoura que muitos lesados medulares reportam. A ideia de que uma resposta neuroinflamatória intensa tem papel fundamental na geração da dor neuropática após a lesão medular ganhou força com estudos demonstrando mecanismos equivalentes entre o sistema nervoso periférico e central. Apesar disso, esta é uma condição sem tratamento eficaz, de modo que a compreensão acerca de seus mecanismos se faz primordial na busca por novos alvos terapêuticos.

Desse modo, buscando avaliar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da dor neuropática após a lesão medular,

padronizamos um modelo experimental de hemissecção da medula espinhal, entre os níveis T₉ e T₁₀, em ratos Wistar e camundongos CD1. Após a hemissecção, avaliamos a resposta dos animais frente ao estímulo mecânico das patas anteriores e posteriores. Os animais não apresentaram alteração de resposta ao estímulo mecânico nos membros anteriores, sugerindo ausência de hiperalgesia acima do nível da lesão medular. No entanto, houve um aumento significativo na resposta comportamental à estimulação de ambas as patas posteriores com os dois filamentos utilizados. Ainda, no segundo dia após a cirurgia foi possível notar uma queda da resposta da pata posterior esquerda, quando comparada à avaliação anterior à lesão, o que se deve ao choque medular e corresponde à suspensão transitória da função e reflexos abaixo do nível da lesão. O choque medular pode durar de dias a semanas, porém os efeitos geralmente desaparecem dentro de 24 horas. Os sintomas incluem perda da sensibilidade, ausência de reflexos profundos e alteração térmica abaixo do nível da lesão, entre outros (Tuli *et al.*, 2007; Popa *et al.*, 2010).

Embora seja atualmente aceito que a resposta após a lesão medular apresente algumas diferenças entre camundongos e ratos, as duas espécies são comumente utilizadas em modelos experimentais para o estudo do reparo do SNC. As diferenças já constatadas entre as espécies incluem os mecanismos de infiltração de células T, cavitação e angiogênese, entre outros (Sroga *et al.*, 2003; Surey *et al.*, 2014). Apesar disso, nossos resultados estão de acordo com aqueles apresentados por Christensen e colaboradores (1996) para ratos, ao evidenciarmos a presença de dor em ambas as patas posteriores dos animais, apesar da lesão medular primária ter sido unilateral. Da mesma forma, pudemos

padronizar este modelo de lesão medular em camundongos, os quais apresentaram aumento da sensibilidade em ambas as patas posteriores, tratando-se do primeiro estudo, pelo nosso conhecimento, utilizando hemissecção medular em camundongos para avaliação nociceptiva. Após a hemissecção da medula espinhal, ainda estão presentes diversos substratos anatômicos para a transmissão de informação nociceptiva periférica gerada em áreas caudais ao sítio da lesão para centros supraespinhais ipsi e contralaterais, como o trato espinotalâmico. Além disso, há ainda vias propioespinhais curtas que transmitem a informação nociceptiva a partir de um lado ao outro da medula, bem como neurônios da lâmina I da medula que se projetam ipsi- e bilateralmente para regiões do tronco cerebral que controlam os estados comportamentais relacionados à dor. Assim, diversas vias intactas servem de substrato neuroanatômico para a transmissão somatosensorial das patas posteriores aos centros supraespinhais, permitindo a manifestação da dor após a hemissecção da medula espinhal (Basbaum, 1973; Christensen *et al.*, 1996)

Diversos estudos nas últimas décadas dedicaram-se a demonstrar os mecanismos ativados por mediadores pró-inflamação na gênese da dor. Porém, o conhecimento acerca da resolução desse processo ainda é reduzido, mas vem ganhando maior visibilidade nos últimos anos. Sabendo-se que a dor crônica não é apenas a continuação da dor inflamatória, mas sim o resultado de alterações persistentes na modulação da dor, a fase de transição de dor aguda para dor crônica pode ser crucial como alvo para tratamento. Dessa forma, tem se demonstrado que a maioria dos processos inflamatórios é auto-limitante, fortalecendo a ideia de que a resolução é um processo endógeno ativo

voltado a proteger o organismo de uma inflamação exacerbada, sendo que o resultado final depende do balanço entre a produção de mediadores pró e anti-inflamatórios e as interações entre eles (Serhan *et al.*, 2007). As lipoxinas pertencem a uma família de eicosanoides gerados a partir do ácido araquidônico através de ações sequenciais de lipoxigenases (Serhan, 2005). Tendo sido o primeiro grupo descrito de lipídeos com ações pró-resolução, as lipoxinas são reconhecidas por reduzirem a produção de citocinas pró-inflamatórias, inibirem a proliferação celular e estimularem a fagocitose não-flogística de leucócitos apoptóticos, sugerindo que as mesmas participem de um sistema de defesa do organismo, reduzindo a inflamação, as reações de hipersensibilidade e a dor inflamatória e neuropática (Brady e Serhan, 1996; Svensson *et al.*, 2007; Serhan *et al.*, 2011). Devido ao quadro neuroinflamatório persistente que caracteriza a lesão medular, nossa hipótese foi que a administração espinal de LXA4 seria capaz de reduzir a inflamação e a dor decorrentes do trauma medular. Dessa forma, o presente estudo buscou elucidar os mecanismos envolvidos nos efeitos anti-nociceptivos e pró-resolução da LXA4 na medula espinal após a lesão traumática experimental.

De forma interessante, em nosso modelo de estudo observamos o aumento nos níveis de LXA4 no sítio da lesão através da sua mensuração na medula espinal de animais submetidos à lesão medular. Corroborando com esses achados, é sabido que em áreas inflamadas, os neutrófilos podem interagir com outras células vizinhas e produzir lipoxinas, que impedem a diapedese de neutrófilos e seu recrutamento para os tecidos. Sabe-se também que os neutrófilos mudam seu fenótipo para produzir perfis diferentes de mediadores lipídicos de acordo com as

células e substratos presentes no meio em que se encontram. Por exemplo, neutrófilos presentes em exsudatos inflamatórios passam a produzir lipoxinas e resolvinas, em vez de produzirem leucotrienos. Outros tipos celulares podem gerar lipoxinas quando expostos a citocinas e fatores de crescimento específicos ou, no caso dos macrófagos, por exemplo, quando fagocitam leucócitos apoptóticos (Serhan *et al.*, 2008). Essas informações são importantes para compreender os mecanismos pró-resolução, uma vez que a LXA4 gerada pelos macrófagos provavelmente contribui para estimular sua própria atividade fagocítica, sem que haja a liberação de mediadores pro-inflamatórios. Talvez um mecanismo dessa natureza possa justificar o aumento observado de LXA4 na medula espinhal após a lesão, considerando a intensa resposta inflamatória que ocorre no local. Outra possibilidade seria o aumento da expressão de lipoxigenase que ocorre durante a inflamação, que acarretaria no aumento da LXA4 mensurada na medula. Embora não tenhamos avaliado nesse estudo, é possível que haja uma elevação no teor de lipoxinas durante a fase normal de resolução da dor e, contrariamente, uma capacidade reduzida de produção espinhal de lipoxinas deve levar ao quadro de dor persistente. No entanto, apesar dessas possibilidades ainda não terem sido investigadas, cabe ressaltar que, até onde sabemos, este é o primeiro relato de aumento de biossíntese de LXA4 descrito na lesão medular experimental.

A LXA4 foi o primeiro ligante endógeno identificado para o receptor ALX/FPR2, o qual está expresso em diversos tecidos e células como coração, fígado, baço, monócitos, neutrófilos e astrócitos, entre outros (Chiang *et al.*, 2006; Svensson *et al.*, 2007; Serhan *et al.*, 2011).

Embora o receptor possa interagir com diversos ligantes e acoplar-se a diferentes vias de sinalização, sabe-se que a ativação do ALX/FPR2 pela lipoxina impede o recrutamento de neutrófilos, promovendo a resolução da inflamação por estimular macrófagos e monócitos a realizarem fagocitose sem que liberem citocinas ou quimiocinas (Chiang *et al.*, 2006; Serhan *et al.*, 2008). Dessa forma, avaliamos a expressão do RNAm para o receptor ALX/FPR2 na medula espinhal dos animais e também no GRD de ratos, e observamos um aumento significativo do mesmo na medula espinhal de ambas as espécies estudadas. Por outro lado, não foi possível detectar qualquer nível de expressão do RNAm para o receptor ALX/FPR2 no GRD, reforçando a ideia de que a modulação da dor pela lipoxina se deve a uma ação local na própria medula espinhal. Nossos resultados estão de acordo com o trabalho de Svensson e colaboradores (2007), no qual foi demonstrada a expressão do receptor ALX/FPR2 na medula espinhal de ratos, mas não no GRD.

Após a padronização do modelo de hemisseção, que nos permitiu observar o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica abaixo do nível da lesão, e das evidências do aumento nos níveis de LXA4 e do RNAm do seu receptor, avaliamos o possível efeito antinociceptivo da LXA4. Assim, tratamos os animais com duas injeções intratecais de LXA4, em 4 e 24 horas após a lesão medular, tendo em vista a resposta inflamatória aguda que ocorre nesse período. Ao reforçar os níveis desse mediador pró-resolução na medula espinhal, observamos uma redução significativa na hiperalgesia mecânica das patas posteriores em ambas as espécies durante o período de observação de 28 dias. Avaliamos ainda os camundongos com lesão medular por uma semana adicional e realizamos nova administração de LXA4 no 35º dia após a lesão, a qual

se mostrou capaz de reduzir a sensibilidade mecânica dos animais. Ainda, o tratamento com LXA4 logo após a lesão reduziu o RNAm para o receptor ALX/FPR2 e a expressão de marcadores inflamatórios e celulares como Iba-1, GFAP e TNF- α na medula espinhal de camundongos submetidos à hemissecção.

Nesse contexto, precisamos considerar os dados obtidos com relação aos marcadores de microglia (Iba-1) e astrócitos (GFAP), os quais se apresentaram elevados nas fases aguda e crônica da lesão medular, sugerindo a participação dessas células na modulação e manutenção da dor. Sabemos que a perda de homeostase na medula espinhal faz com que células imunes residentes no corno dorsal da medula espinhal se alterem para um fenótipo reativo, relacionado à dor neuropática (Meller *et al.*, 1994; Grace *et al.*, 2011; Grace *et al.*, 2014). Mediadores derivados das células imunes e da glia difundem-se e ligam-se a receptores pré- e pós-sinápticos em sinapses do corno dorsal para modular as transmissões sinápticas inibitórias e excitatórias (Kawasaki *et al.*, 2008). Como resultado, há desenvolvimento de hipersensibilidade nociceptiva, que é uma característica marcante da sensibilização central (Woolf e Salter, 2000). Entretanto, quando comparados aos neurotransmissores clássicos, os mediadores imunes são muito mais potentes e assim conseguem modular a transmissão sináptica em concentrações significativamente mais baixas, o que deve ser levado em consideração (Ji *et al.*, 2013).

Mediadores como a IL-1 β , o fator de necrose tumoral (TNF) e algumas quimiocinas podem modular diretamente a transmissão sináptica excitatória de fibras aferentes primárias e neurônios de segunda ordem, uma vez que há um acoplamento entre os receptores de

IL-1 β e os receptores pré-sinápticos NMDA, e os canais TRPA1 e TRPV1, levando à liberação de glutamato, de maneira dependente do cálcio (Yan e Weng, 2013). Já o TNF- α , a prostaglandina E₂ e algumas quimiocinas podem aumentar a expressão de receptores AMPA na superfície dos neurônios pós-sinápticos (de segunda ordem), sensibilizando-os e tornando-os mais vulneráveis à excitotoxicidade. Ainda, esses mediadores, juntamente com a IL-6, diminuem a sinalização inibitória no corno dorsal por reduzirem a liberação de GABA e de glicina dos interneurônios ali presentes e das projeções descendentes inibitórias (Park *et al.*, 2011; Grace *et al.*, 2014).

De fato, a ativação glial tem sido considerada um mecanismo fundamental na gênese da dor crônica, e se manifesta por alterações morfológicas e aumento na expressão de marcadores gliais, como CD11b e Iba-1 em microglia e GFAP e S100 em astrócitos (Ji *et al.*, 2013). Geralmente, a microglia age como a primeira linha de defesa do SNC frente a lesão, reconhecendo, sequestrando e processando antígenos. Entretanto, estas células expressam muitos dos mesmos receptores para neurotransmissores que estão presentes em astrócitos e em neurônios. A ativação destes receptores pode estimular a microglia a produzir e liberar diversas substâncias capazes de ativar astrócitos e neurônios (Pocock e Kettenmann, 2007; Milligan e Watkins, 2009). O TNF- α é uma das citocinas inflamatórias mais estudadas e potentes, sendo produzido principalmente pela microglia, astrócitos e neurônios primários do GRD. Embora a maioria das células da microglia (90%) e dos astrócitos (40%) expresse TNF- α , os neurônios da medula espinhal não o expressam, o que sugere que a principal fonte de TNF- α na medula espinhal seja a micróglia (Xu *et al.*, 2006; Berta *et al.*, 2014).

Além disso, outras citocinas, como IL-1 β , IL-18, além das quimiocinas MCP-1 e CXCL-1, também são produzidas pela microglia e por astrócitos, e podem facilitar o desenvolvimento da dor neuropática (Gao *et al.*, 2009; Ji *et al.*, 2014).

Nesse sentido, Hains e Waxman (2006) demonstraram que a ativação microglial crônica na medula espinhal após uma lesão medular torácica contribui para a hiperreatividade neuronal em níveis lombares e a manutenção da dor crônica abaixo do nível da lesão (Hains e Waxman, 2006). Em seguida, o mesmo grupo demonstrou que a microglia contribui para a dor após a lesão medular através da liberação de prostaglandina E2 (Zhao *et al.*, 2007b). Outros estudos sugerem que a atividade da microglia é mais importante para a indução do que para a manutenção da dor neuropática tardia após a lesão medular, assim como observado em diferentes modelos de dor neuropática periférica (Raghavendra *et al.*, 2003; Ledebøer *et al.*, 2005). A administração de minociclina, um inibidor da ativação da microglia, foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica e térmica das patas posteriores dos animais quando aplicada logo após a lesão medular torácica, mas nenhum efeito foi observado com tratamentos mais tardios (Hains e Waxman, 2006; Zhao *et al.*, 2007b). Da mesma maneira, o bloqueio da liberação de TNF- α imediatamente após a hemissecção da medula espinhal em T13 reduziu a sensibilidade mecânica durante 4 semanas, enquanto o tratamento realizado de 2 a 3 semanas após o trauma foi desprovido de efeito (Marchand *et al.*, 2009).

Existem mecanismos que poderiam, potencialmente, controlar ativamente essa sinalização imune central, os quais incluem a produção de mediadores anti-inflamatórios e a polarização de células

especializadas com fenótipo anti-inflamatório, para prevenir a inflamação descontrolada. Então, uma célula “reativa” não necessariamente implica em um estado pró-inflamatório ou pró-nociceptivo, já que, dependendo do estímulo, subpopulações de células imunes ativadas podem atuar como anti-inflamatórias (Sabat *et al.*, 2010; Clark *et al.*, 2013).

Levando em consideração todas essas informações, avaliamos a influência da lesão medular em ratos Wistar sobre a liberação de citocinas na medula espinhal e os efeitos da LXA4 sobre as mesmas. Observamos que a injeção intratecal de LXA4 reduziu a magnitude do aumento induzido pela lesão medular das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α , além de promover a liberação da citocina anti-inflamatória IL-10. Atualmente, uma parcela grande de estudos tem como estratégia de investigação bloquear os sinais que direcionam o desenvolvimento da dor crônica, seja reduzindo a geração de um único fator (por exemplo, PGE2 ou óxido nítrico), ou impedindo que determinados mediadores atuem em seus receptores específicos (como a substância P ou o glutamato). Embora tais estratégias muitas vezes reduzam a nocicepção, a interferência em alvos que atuem em uma vasta gama de fatores envolvidos na dor pode ser uma abordagem mais vantajosa. Nossos resultados sugerem que o uso de um agonista capaz de ativar vias de ação pró-resolução constitui uma abordagem efetiva em regular a sinalização nociceptiva em condições inflamatórias dolorosas. É interessante ressaltar que níveis reduzidos das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 podem ser encontrados em pacientes com dor crônica (Uceyler *et al.*, 2006). Da mesma forma, a administração sistêmica ou espinhal de IL-4 e IL-10, na forma de proteína ou por

transferência genética, reduz a hipersensibilidade em modelos experimentais de dor, reforçando a importância de um sistema contra-regulatório na sinalização da dor (Milligan *et al.*, 2005).

Estas observações reforçam a ideia de uma sinalização inicial pela micróglia reativa, nos primeiros momentos que seguem a lesão medular, que promove a ativação duradoura de astrócitos e a consequente manutenção da dor, o que se alinharia aos nossos resultados demonstrando a eficácia da LXA4, administrada logo após a lesão medular, em reduzir a hiperalgesia mecânica dos animais e a expressão de Iba-1 e TNF- α .

Na dor neuropática, a inflamação que ocorre nas lâminas superficiais da medula espinhal é um ponto determinante para o processamento e transmissão dos sinais nociceptivos, sendo que as células da glia desempenham um importante papel nas respostas neuroinflamatórias. Assim, a ativação dessas células pode ser o fenômeno responsável pela liberação de citocinas pró-inflamatórias e a manutenção da sensibilização central. Outros trabalhos recentes demonstraram que as lipoxinas podem reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, atenuando a hipersensibilidade mecânica em modelos de dor neuropática (Hu *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013), além de serem capazes de aumentar os níveis de IL-10 no SNC (Medeiros *et al.*, 2013). Dessa forma, ao atenuar a liberação de mediadores pró-inflamatórios e promover o aumento daqueles que são anti-inflamatórios, a LXA4 reduz o nível de inflamação no local da lesão e o estado de ativação das células imunes causando a redução da hipersensibilidade.

As lipoxinas atuam no receptor ALX/FPR2, o qual foi clonado de

células polimorfonucleares, monócitos, células T, enterócitos e fibroblastos (Serhan, 2005). As ações antihiperálgicas observadas após a injeção intratecal de LXA4, LXB4 e ATL indicam a ação destes mediadores lipídicos em alvos específicos na medula espinhal. Para entender a relação entre a LXA4, o receptor ALX/FPR2 e o processamento da dor, se faz necessário investigar em que tipo celular o receptor é expresso. De acordo com a literatura, sabemos que no SNC o receptor está expresso principalmente em astrócitos e neurônios (Svensson *et al.*, 2007; Medeiros *et al.*, 2013), mas ainda não há relatos de sua expressão em células da microglia. Através da análise por eletroforese em gel e imunoistoquímica, nossos resultados demonstraram a expressão do receptor em cultura de células de microglia do córtex frontal de camundongos. Embora também tenham sido realizados experimentos para tentar avaliar a expressão de receptores na medula espinhal, utilizando as técnicas de western blot e imunoistoquímica, dificuldades técnicas relacionadas à especificidade dos anticorpos para esse tipo de tecido nos impediram de realizar uma quantificação precisa dos seus níveis, bem como da sua co-localização com células presentes na medula espinhal. No entanto, a observação de que os receptores ALX/FPR2 podem estar presentes também na microglia no SNC, conforme comprovam nossos dados, permite-nos sugerir que os efeitos apresentados pela LXA4 na redução da neuroinflamação e da hiperálgia decorrente da lesão medular podem ser mediados pela sua ação em células da microglia. Conforme mencionado anteriormente, a LXA4 foi o primeiro ligante endógeno lipídico identificado para o receptor ALX/FPR2. As ações da LXA4 envolvem a redução da atividade de células polimorfonucleares,

promovendo a liberação de leucócitos aderentes e induzindo neles as vias de apoptose e fagocitose (Gavins *et al.*, 2003; El Kebir *et al.*, 2008; Dufton e Perretti, 2010). Oposto ao que ocorre com outros ligantes peptídicos deste receptor, as ações da LXA4 são decorrentes da sua interação com sítios de ligação distintos daqueles utilizados pelos outros ligantes (Chiang *et al.*, 2006), além de também alterar as vias de sinalização que envolvem as MAPKs (Dufton e Perretti, 2010).

Dentre as múltiplas alterações de função que a glia pode apresentar após um estímulo nocivo, podemos incluir a fosforilação de MAPKs. Esta família inclui três membros principais: ERK $\frac{1}{2}$ (quinase regulada por sinal extracelular), p38 e JNK (quinase c-Jun-N-terminal). As vias das MAPKs desempenham um papel fundamental na sinalização intracelular em neurônios e glia, as duas células necessárias para a gênese da dor persistente (Obata e Noguchi, 2004; Ji *et al.*, 2009). É interessante notar que as células gliais exibem padrões de ativação de MAPKs distintos após lesões dolorosas. Diversos estudos demonstram o aumento da fosforilação de p38 (p-p38) na micróglia da medula espinhal após lesões de nervo (Tsuda *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2008), ou durante a dor inflamatória aguda induzida por formalina (Svensson *et al.*, 2003), a dor pós-operatória (Wen *et al.*, 2009) e a lesão medular (Hains e Waxman, 2006; Crown *et al.*, 2008), sugerindo que a ativação de MAPKs nestas células é essencial para a manutenção da dor (Ji *et al.*, 2009; Ji *et al.*, 2013). Assim, a administração de inibidores das MAPKs é capaz de reduzir a inflamação, a dor e também o componente afetivo da dor após lesões da medula espinhal (Zhao *et al.*, 2007a; Crown *et al.*, 2008; Gwak *et al.*, 2009; Galan-Arriero *et al.*, 2014).

De maneira interessante, Wang e colaboradores (2014)

demonstraram um efeito anti-inflamatório e analgésico da administração de ATL em ratos submetidos a constrição crônica do nervo ciático, mediado através da inibição da via JAK2/STAT3 e da redução de citocinas pró-inflamatórias (Wang *et al.*, 2014). Dessa forma, nossos dados sugerem que um dos mecanismos de ação pelos quais a LXA4 reduz a hiperalgesia mecânica observada nos animais com lesão medular seja pela inibição da fosforilação da proteína p38 em células da microglia, uma vez que observamos uma redução dos níveis dessa proteína nas células tratadas com LXA4.

As ações das lipoxinas tem se mostrado potentes e específicas para cada tipo celular, gerando respostas relevantes para a redução da inflamação aguda e a promoção ativa da resolução. Os primeiros estudos demonstraram que as lipoxinas podem atuar através da interação com alvos variados, como: 1) seus receptores de superfície específicos, ALX/FPR2, no qual age estereoseletivamente para promover os efeitos pró-resolução (Fiore *et al.*, 1994; Takano *et al.*, 1997); 2) os receptores BLT1, cysLT1 ou cysLT2 para leucotrienos, bloqueando as respostas pró-inflamatórias (Gronert *et al.*, 2001; Brink *et al.*, 2003); ou 3) alvos intracelulares nas células de origem, como a PKC, para regulação de respostas celulares (Hansson *et al.*, 1986). Mais recentemente, outros mecanismos foram relatados, como a interação com receptores Ahr (Machado *et al.*, 2006) e a modulação do receptor canabinóide CB1 (Pamplona *et al.*, 2012).

Dessa maneira, uma questão relevante relacionada ao nosso estudo era saber se os efeitos da LXA4 observados seriam mediados através do receptor ALX/FPR2. Assim, utilizamos o silenciamento gênico do receptor ALX/FPR2, através do emprego do siRNA específico

intratecal, sendo que uma das administrações foi realizada em conjunto com a LXA4. Considerando o tempo de atuação do siRNA, o esquema de tratamento utilizado no estudo e a presença de dor, optamos por uma administração prévia do siRNA e uma em conjunto com a LXA, a fim de avaliarmos a sensibilidade mecânica no sétimo dia pós operatório, no qual a sensibilidade está presente apenas na pata contralateral.

Dessa maneira, nossos dados sugerem que os efeitos analgésicos da LXA4 ocorrem, pelo menos em parte, por interação com o receptor ALX/FPR2 uma vez que, após o silenciamento gênico, a LXA4 não foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica apresentada na pata contralateral dos animais.

Este receptor acoplado à proteína G pertence a uma família de três membros (FPR1, ALX/FPR2 e FPR3) sendo expresso em diversos tipos de células e tecidos (Chiang *et al.*, 2006). Demonstrou-se que a transcrição do ALX/FPR2 é aumentada por diversas citocinas, sugerindo a regulação do receptor em um ambiente inflamatório (Gronert *et al.*, 1998; Sodin-Semrl *et al.*, 2000). As ações protetoras da LXA4 e da ATL são dependentes de ligante e receptor, já que o aumento da expressão do receptor ALX reduz significativamente a infiltração de neutrófilos após a ligação da LXA4 (Devchand *et al.*, 2003). Nesse sentido, a proteína anti-inflamatória anexina-1, também reconhecida pela redução de adesão de neutrófilos e apoptose, tem suas ações mediadas também pelo receptor ALX/FPR2, reforçando a participação do mesmo em ações anti-inflamatórias e pró-resolução (Migeotte *et al.*, 2006; Maderna *et al.*, 2010).

Diante dos dados apresentados, nosso estudo demonstrou que a LXA4 foi efetiva em prevenir a dor neuropática decorrente da lesão

medular, apontando seu potencial como nova alternativa terapêutica, já que seus efeitos anti-hiperalgésicos produzidos por administração logo após a lesão medular sustentaram-se até 28 dias, e ainda puderam ser promovidos de novo após nova administração no 35º dia em camundongos. Além disso, eles demonstram que as ações benéficas deste mediador estão associadas com a diminuição da fosforilação da MAPK p38 e liberação de TNF- α *in vitro* e a redução na expressão de citocinas e ativação celular *in vivo*, sugerindo que a ativação do receptor ALX/FPR2 pela LXA4 na microglia promove a resolução inflamatória e a antinocicepção.

Estes achados são importantes uma vez que reforçam a ideia da participação de células não-neuronais na modulação da atividade neuronal sensorial, não apenas através da sensibilização, mas da normalização das sinalizações da dor neuropática decorrente da lesão medular.

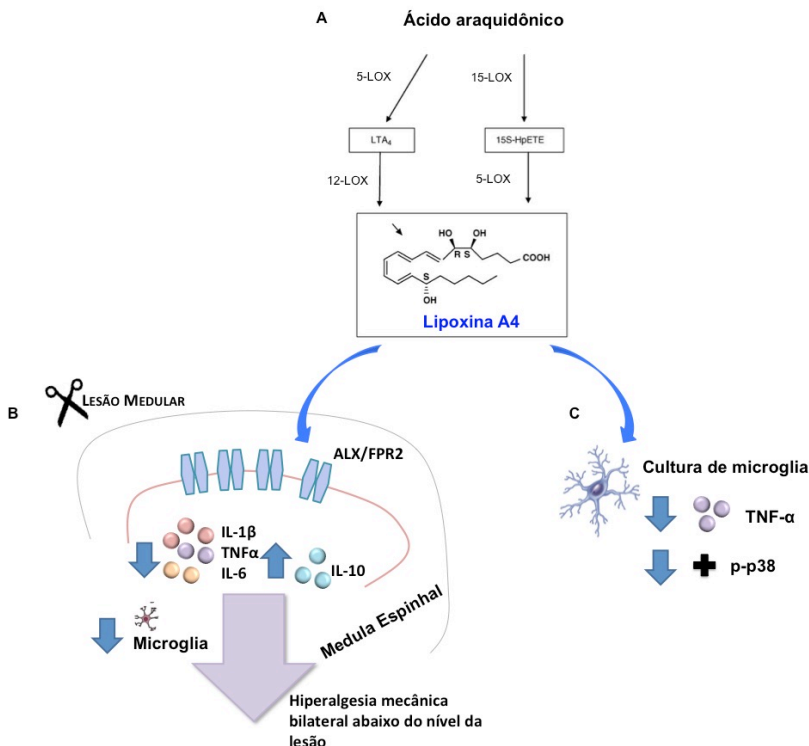


Figura 24. Representação esquemática da formação da lipoxina A4 e dos efeitos produzidos pela sua administração após a lesão medular. A enzima 15-lipoxigenase (15-LOX) produz a partir do ácido araquidônico um intermediário chamado de 15S-HpETE, o qual é convertido pela 5-lipoxigenase (5-LOX) dos neutrófilos a LXA4. Além disso, ela também pode ser produzida pela ação da 12-lipoxigenase (12-LOX) das plaquetas, convertendo leucotrieno A4 (LTA4) a LXA4 (A). A administração intratecal de LXA4 reduziu os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α e da ativação microglial, avaliada pela expressão de Iba-1, além de aumentar os níveis da citocina antiinflamatória IL-10. Estas ações, mediadas pela ligação ao receptor ALX/FPR2, promoveram a redução da hiperalgesia mecânica após a lesão medular (B). Em culturas de micróglia, a LXA4 reduziu a ativação da proteína MAPK p38, avaliada pela fosforilação da proteína, e a liberação de TNF- α .

6. CONCLUSÕES

O presente estudo buscou avaliar mediadores inflamatórios e marcadores celulares envolvidos no desenvolvimento da dor neuropática após a lesão medular, a fim de esclarecer potenciais mecanismos envolvidos na modulação e prevenção deste tipo de dor crônica. Embora a transposição de estudos experimentais para aplicações clínicas não seja algo simples e direto, nossos resultados nos permitem sugerir que células não-neuronais relacionadas com a modulação do desenvolvimento da dor crônica podem constituir melhores alvos de tratamento.

Além disso, nossos resultados acrescentam uma grande rede de informações a respeito dos mediadores lipídicos pró-resolução na dor neuropática, servindo como valiosas informações para a compreensão do mecanismo de ação desses mediadores na lesão medular.

7. REFERÊNCIAS

- ALLAN, S. M.; ROTHWELL, N. J. Cytokines and acute neurodegeneration. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 10, p. 734-44, Oct 2001.
- BAE, Y. S. et al. Differential activation of formyl peptide receptor-like 1 by peptide ligands. **J Immunol**, v. 171, n. 12, p. 6807-13, Dec 15 2003.
- BANNENBERG, G.; SERHAN, C. N. Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. **Biochim Biophys Acta**, v. 1801, n. 12, p. 1260-73, Dec 2010.
- BASBAUM, A. I. Conduction of the effects of noxious stimulation by short-fiber multisynaptic systems of the spinal cord in the rat. **Exp Neurol**, v. 40, n. 3, p. 699-716, Sep 1973.
- BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-84, Oct 16 2009.
- BASSO, D. M.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. **J Neurotrauma**, v. 12, n. 1, p. 1-21, Feb 1995.
- BERKOVSKY, T. C. **Handbook of spinal cord injuries : types, treatments and prognosis**. New York: Nova Science Publishers, 2010. xxiv, 759 p. ISBN 9781608760022
- BERTA, T. et al. Acute morphine activates satellite glial cells and up-regulates IL-1beta in dorsal root ganglia in mice via matrix metalloprotease-9. **Mol Pain**, v. 8, p. 18, 2012.
- BERTA, T. et al. Extracellular caspase-6 drives murine inflammatory pain via microglial TNF-alpha secretion. **J Clin Invest**, v. 124, n. 3, p. 1173-86, Mar 2014.
- BRADY, H. R.; SERHAN, C. N. Lipoxins: putative braking signals in host defense, inflammation and hypersensitivity. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 5, n. 1, p. 20-7, Jan 1996.

BRESNAHAN, J. C. et al. A behavioral and anatomical analysis of spinal cord injury produced by a feedback-controlled impaction device. **Exp Neurol**, v. 95, n. 3, p. 548-70, Mar 1987.

BRINK, C. et al. International Union of Pharmacology XXXVII. Nomenclature for leukotriene and lipoxin receptors. **Pharmacol Rev**, v. 55, n. 1, p. 195-227, Mar 2003.

BROWN-SÉQUARD, C. E. Lectures ON THE PHYSIOLOGY AND PATHOLOGY OF THE NERVOUS SYSTEM; AND ON THE TREATMENT OF ORGANIC NERVOUS AFFECTIONS. **The Lancet**, v. 92, n. 2358, p. 593-596, Nov. 1868.

BUCKLEY, C. D.; GILROY, D. W.; SERHAN, C. N. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. **Immunity**, v. 40, n. 3, p. 315-27, Mar 20 2014.

CARLSON, N. G. et al. Cyclooxygenase-2 expression in oligodendrocytes increases sensitivity to excitotoxic death. **J Neuroinflammation**, v. 7, p. 25, 2010.

CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J Neurosci Methods**, v. 53, n. 1, p. 55-63, Jul 1994.

CHEN, G. et al. Connexin-43 induces chemokine release from spinal cord astrocytes to maintain late-phase neuropathic pain in mice. **Brain**, v. 137, n. Pt 8, p. 2193-209, Aug 2014.

CHIANG, N. et al. The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo. **Pharmacol Rev**, v. 58, n. 3, p. 463-87, Sep 2006.

CHIANG, N. et al. A novel rat lipoxin A4 receptor that is conserved in structure and function. **Br J Pharmacol**, v. 139, n. 1, p. 89-98, May 2003.

CHRISTENSEN, M. D. et al. Mechanical and thermal allodynia in chronic central pain following spinal cord injury. **Pain**, v. 68, n. 1, p. 97-107, Nov 1996.

CHRISTENSEN, M. D.; HULSEBOSCH, C. E. Chronic central pain after spinal cord injury. **J Neurotrauma**, v. 14, n. 8, p. 517-37, Aug 1997.

CHRISTIANSON, C. A. et al. Spinal TLR4 mediates the transition to a persistent mechanical hypersensitivity after the resolution of inflammation in serum-transferred arthritis. **Pain**, v. 152, n. 12, p. 2881-91, Dec 2011.

CLARIA, J.; SERHAN, C. N. Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 21, p. 9475-9, Oct 10 1995,

CLARK, A. K.; OLD, E. A.; MALCANGIO, M. Neuropathic pain and cytokines: current perspectives. **J Pain Res**, v. 6, p. 803-14, 2013.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Annu Rev Neurosci**, v. 32, p. 1-32, 2009.

CROWE, M. J. et al. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. **Nat Med**, v. 3, n. 1, p. 73-6, Jan 1997.

CROWN, E. D. et al. Activation of p38 MAP kinase is involved in central neuropathic pain following spinal cord injury. **Exp Neurol**, v. 213, n. 2, p. 257-67, Oct 2008.

DASARI, V. R.; VEERAVALLI, K. K.; DINH, D. H. Mesenchymal stem cells in the treatment of spinal cord injuries: A review. **World J Stem Cells**, v. 6, n. 2, p. 120-33, Apr 26 2014.

DETLOFF, M. R. et al. Validity of acute and chronic tactile sensory testing after spinal cord injury in rats. **Exp Neurol**, v. 225, n. 2, p. 366-76, Oct 2010.

DETLOFF, M. R. et al. Acute and chronic tactile sensory testing after spinal cord injury in rats. **J Vis Exp**, n. 62, p. e3247, 2012.

DEVCHAND, P. R. et al. Human ALX receptor regulates neutrophil recruitment in transgenic mice: roles in inflammation and host defense. **FASEB J**, v. 17, n. 6, p. 652-9, Apr 2003.

DONNELLY, D. J.; POPOVICH, P. G. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. **Exp Neurol**, v. 209, n. 2, p. 378-88, Feb 2008.

DUFTON, N.; PERRETTI, M. Therapeutic anti-inflammatory potential of formyl-peptide receptor agonists. **Pharmacol Ther**, v. 127, n. 2, p. 175-88, Aug 2010. I

DUMONT, R. J. et al. Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. **Clin Neuropharmacol**, v. 24, n. 5, p. 254-64, Sep-Oct 2001.

EL KEBIR, D.; JOZSEF, L.; FILEP, J. G. Opposing regulation of neutrophil apoptosis through the formyl peptide receptor-like 1/lipoxin A4 receptor: implications for resolution of inflammation. **J Leukoc Biol**, v. 84, n. 3, p. 600-6, Sep 2008.

FAULKNER, J. R. et al. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. **J Neurosci**, v. 24, n. 9, p. 2143-55, Mar 3 2004.

FEHLINGS, M. G.; WILSON, J. R.; CHO, N. Methylprednisolone for the treatment of acute spinal cord injury: counterpoint. **Neurosurgery**, v. 61 Suppl 1, p. 36-42, Aug 2014.

FIGUEROA, J. D. et al. Docosahexaenoic acid pretreatment confers protection and functional improvements after acute spinal cord injury in adult rats. **J Neurotrauma**, v. 29, n. 3, p. 551-66, Feb 10 2012.

FINNERUP, N. B. Pain in patients with spinal cord injury. **Pain**, v. 154 Suppl 1, p. S71-6, Dec 2013.

FINNERUP, N. B.; BAASTRUP, C.; JENSEN, T. S. Neuropathic pain following spinal cord injury pain: mechanisms and treatment. **Scandinavian Journal of Pain**, v. 1, Supplement 1, n. 0, p. S3-S11, 5// 2009.

FIORE, S. et al. Identification of a human cDNA encoding a functional high affinity lipoxin A4 receptor. **J Exp Med**, v. 180, n. 1, p. 253-60, Jul 1 1994.

FIORE, S. et al. Lipoxin recognition sites. Specific binding of labeled lipoxin A4 with human neutrophils. **J Biol Chem**, v. 267, n. 23, p. 16168-76, Aug 15 1992.

FIORE, S.; SERHAN, C. N. Lipoxin A4 receptor activation is distinct from that of the formyl peptide receptor in myeloid cells: inhibition of CD11/18 expression by lipoxin A4-lipoxin A4 receptor interaction. **Biochemistry**, v. 34, n. 51, p. 16678-86, Dec 26 1995.

FITCH, M. T.; SILVER, J. 3 - Glial Cells, Inflammation, and CNS Trauma: Modulation of the Inflammatory Environment After Injury Can Lead to Long-Distance Regeneration Beyond the Glial Scar. In: TUSZYNSKI, J. H. K. H. (Ed.). **CNS Regeneration (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2008. p.59-94. ISBN 978-0-12-373994-0.

FLEMING, J. C. et al. The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. **Brain**, v. 129, n. Pt 12, p. 3249-69, Dec 2006.

GALAN-ARRIERO, I. et al. Oral administration of the p38alpha MAPK inhibitor, UR13870, inhibits affective pain behavior after spinal cord injury. **Pain**, v. 155, n. 10, p. 2188-98, Oct 2014.

GAO, Y. J.; JI, R. R. c-Fos and pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury? **Open Pain J**, v. 2, p. 11-17, Jan 1 2009.

_____. Chemokines, neuronal-glial interactions, and central processing of neuropathic pain. **Pharmacol Ther**, v. 126, n. 1, p. 56-68, Apr 2010.

GAO, Y. J. et al. JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain. **J Neurosci**, v. 29, n. 13, p. 4096-108, Apr 1 2009.

GAVINS, F. N. et al. Leukocyte antiadhesive actions of annexin 1: ALXR- and FPR-related anti-inflammatory mechanisms. **Blood**, v. 101, n. 10, p. 4140-7, May 15 2003.

GENOVESE, T. et al. Evidence for the role of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in the development of spinal cord injury. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 325, n. 1, p. 100-14, Apr 2008.

GERZANICH, V. et al. De novo expression of Trpm4 initiates secondary hemorrhage in spinal cord injury. **Nat Med**, v. 15, n. 2, p. 185-91, Feb 2009.

GISZTER, S. F. Spinal cord injury: present and future therapeutic devices and prostheses. **Neurotherapeutics**, v. 5, n. 1, p. 147-62, Jan 2008.

GOSSELIN, R. D. et al. Glial cells and chronic pain. **Neuroscientist**, v. 16, n. 5, p. 519-31, Oct 2010.

GRACE, P. M. et al. Pathological pain and the neuroimmune interface. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 4, p. 217-31, Apr 2014.

GRACE, P. M.; ROLAN, P. E.; HUTCHINSON, M. R. Peripheral immune contributions to the maintenance of central glial activation underlying neuropathic pain. **Brain Behav Immun**, v. 25, n. 7, p. 1322-32, Oct 2011.

GRONERT, K. et al. Identification of a human enterocyte lipoxin A4 receptor that is regulated by interleukin (IL)-13 and interferon gamma and inhibits tumor necrosis factor alpha-induced IL-8 release. **J Exp Med**, v. 187, n. 8, p. 1285-94, Apr 20 1998.

GRONERT, K. et al. Selectivity of recombinant human leukotriene D(4), leukotriene B(4), and lipoxin A(4) receptors with aspirin-triggered 15-epi-LXA(4) and regulation of vascular and inflammatory responses. **Am J Pathol**, v. 158, n. 1, p. 3-9, Jan 2001.

GWAK, Y. S.; UNABIA, G. C.; HULSEBOSCH, C. E. Activation of p-38alpha MAPK contributes to neuronal hyperexcitability in caudal regions remote from spinal cord injury. **Exp Neurol**, v. 220, n. 1, p. 154-61, Nov 2009.

HAINS, B. C.; WAXMAN, S. G. Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. **J Neurosci**, v. 26, n. 16, p. 4308-17, Apr 19 2006.

HALL, E. D.; SPRINGER, J. E. Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. **NeuroRx**, v. 1, n. 1, p. 80-100, Jan 2004.

HANSSON, A. et al. Activation of protein kinase C by lipoxin A and other eicosanoids. Intracellular action of oxygenation products of arachidonic acid. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 134, n. 3, p. 1215-22, Feb 13 1986.

HAUSMANN, O. N. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. **Spinal Cord**, v. 41, n. 7, p. 369-78, Jul 2003.

HE, R.; SANG, H.; YE, R. D. Serum amyloid A induces IL-8 secretion through a G protein-coupled receptor, FPRL1/LXA4R. **Blood**, v. 101, n. 4, p. 1572-81, Feb 15 2003.

HU, S. et al. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxin alleviate bone cancer pain in association with suppressing expression of spinal proinflammatory cytokines. **J Neuroinflammation**, v. 9, p. 278, 2012.

IASP, I. A. F. T. S. O. P., 2014. Disponível em: < <http://www.iasp-pain.org> >. Acesso em: 01 de Novembro.

JANEWAY, C. A., TRAVERS, P, WALPORT, M, SHLOMCHIK MJ. **Immunobiology: the immune system in health and disease**. 5th edition. New York: Garland Science, 2001.

JI, R. R.; BERTA, T.; NEDERGAARD, M. Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? **Pain**, v. 154 Suppl 1, p. S10-28, Dec 2013.

JI, R. R. et al. MAP kinase and pain. **Brain Res Rev**, v. 60, n. 1, p. 135-48, Apr 2009.

JI, R. R.; XU, Z. Z.; GAO, Y. J. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. **Nat Rev Drug Discov**, v. 13, n. 7, p. 533-48, Jul 2014.

JI, R. R. et al. Emerging roles of resolvins in the resolution of inflammation and pain. **Trends Neurosci**, v. 34, n. 11, p. 599-609, Nov 2011.

JONES, L. L.; MARGOLIS, R. U.; TUSZYNSKI, M. H. The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and

versican are differentially regulated following spinal cord injury. **Exp Neurol**, v. 182, n. 2, p. 399-411, Aug 2003.

JONES, L. L.; SAJED, D.; TUSZYNSKI, M. H. Axonal regeneration through regions of chondroitin sulfate proteoglycan deposition after spinal cord injury: a balance of permissiveness and inhibition. **J Neurosci**, v. 23, n. 28, p. 9276-88, Oct 15 2003.

KAWASAKI, Y. et al. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. **J Neurosci**, v. 28, n. 20, p. 5189-94, May 14 2008.

KING, V. R. et al. Omega-3 fatty acids improve recovery, whereas omega-6 fatty acids worsen outcome, after spinal cord injury in the adult rat. **J Neurosci**, v. 26, n. 17, p. 4672-80, Apr 26 2006.

KOBAYASHI, K. et al. P2Y12 receptor upregulation in activated microglia is a gateway of p38 signaling and neuropathic pain. **J Neurosci**, v. 28, n. 11, p. 2892-902, Mar 12 2008.

KWON, B. K.; OXLAND, T. R.; TETZLAFF, W. Animal models used in spinal cord regeneration research. **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 27, n. 14, p. 1504-10, Jul 15 2002.

LAMMERTSE, D. P. Clinical trials in spinal cord injury: lessons learned on the path to translation. The 2011 International Spinal Cord Society Sir Ludwig Guttman Lecture. **Spinal Cord**, v. 51, n. 1, p. 2-9, Jan 2013.

LEDEBOER, A. et al. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. **Pain**, v. 115, n. 1-2, p. 71-83, May 2005.

LEE, B. B. et al. The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate. **Spinal Cord**, v. 52, n. 2, p. 110-6, Feb 2014.

LI, Q. et al. Involvement of the spinal NALP1 inflammasome in neuropathic pain and aspirin-triggered-15-epi-lipoxin A4 induced analgesia. **Neuroscience**, v. 254, p. 230-40, Dec 19 2013.

LI, Y. et al. Pleiotropic regulation of macrophage polarization and tumorigenesis by formyl peptide receptor-2. **Oncogene**, v. 30, n. 36, p. 3887-99, Sep 8 2011.

LIM, P. A.; TOW, A. M. Recovery and regeneration after spinal cord injury: a review and summary of recent literature. **Ann Acad Med Singapore**, v. 36, n. 1, p. 49-57, Jan 2007.

LIM, S. N. et al. Transgenic mice with high endogenous omega-3 fatty acids are protected from spinal cord injury. **Neurobiol Dis**, v. 51, p. 104-12, Mar 2013.

LIMA-GARCIA, J. F. et al. The precursor of resolvin D series and aspirin-triggered resolvin D1 display anti-hyperalgesic properties in adjuvant-induced arthritis in rats. **Br J Pharmacol**, v. 164, n. 2, p. 278-93, Sep 2011.

MACHADO, F. S. et al. Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. **Nat Med**, v. 12, n. 3, p. 330-4, Mar 2006.

MADERNA, P. et al. FPR2/ALX receptor expression and internalization are critical for lipoxin A4 and annexin-derived peptide-stimulated phagocytosis. **FASEB J**, v. 24, n. 11, p. 4240-9, Nov 2010.

MADERNA, P.; GODSON, C. Lipoxins: resolutionary road. **Br J Pharmacol**, v. 158, n. 4, p. 947-59, Oct 2009.

MARCHAND, F. et al. Effects of Etanercept and Minocycline in a rat model of spinal cord injury. **Eur J Pain**, v. 13, n. 7, p. 673-81, Aug 2009.

MARTINI, A. C. et al. Neuroprotective effects of lipoxin A4 in central nervous system pathologies. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 316204, 2014.

MCDONALD, J. W.; SADOWSKY, C. Spinal-cord injury. **Lancet**, v. 359, n. 9304, p. 417-25, Feb 2 2002.

MCMAHON, B. et al. Lipoxins: revelations on resolution. **Trends Pharmacol Sci**, v. 22, n. 8, p. 391-5, Aug 2001.

MEDEIROS, R. et al. Aspirin-triggered lipoxin A4 stimulates alternative activation of microglia and reduces Alzheimer disease-like pathology in mice. **Am J Pathol**, v. 182, n. 5, p. 1780-9, May 2013.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-35, Jul 24 2008.

MELLER, S. T. et al. The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. **Neuropharmacology**, v. 33, n. 11, p. 1471-8, Nov 1994.

MEYER, F. et al. Alterações vesicais na lesão medular experimental em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 18, p. 0-0, 2003.

MIGEOTTE, I.; COMMUNI, D.; PARMENTIER, M. Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 17, n. 6, p. 501-19, Dec 2006.

MILLIGAN, E. D. et al. Controlling pathological pain by adenovirally driven spinal production of the anti-inflammatory cytokine, interleukin-10. **Eur J Neurosci**, v. 21, n. 8, p. 2136-48, Apr 2005.

MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 1, p. 23-36, Jan 2009.

MYER, D. J. et al. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. **Brain**, v. 129, n. Pt 10, p. 2761-72, Oct 2006. ISSN 1460-2156 (Electronic)

NAKAMURA, M.; OKANO, H. Cell transplantation therapies for spinal cord injury focusing on induced pluripotent stem cells. **Cell Res**, v. 23, n. 1, p. 70-80, Jan 2013.

NORENBERG, M. D.; SMITH, J.; MARCILLO, A. The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. **J Neurotrauma**, v. 21, n. 4, p. 429-40, Apr 2004.

NSCISC, N. S. C. I. S. C. **Annual report for the spinal cord injury model system**. <http://www.nscisc.uab.edu>. 2013

O'BRIEN, M. D. Spinal cord injury: progress, promise and priorities. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 99, n. 11, p. 585-585, 2006..

OBATA, K.; NOGUCHI, K. MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. **Life Sci**, v. 74, n. 21, p. 2643-53, Apr 9 2004.

OHTAKE, Y.; LI, S. Molecular mechanisms of scar-sourced axon growth inhibitors. **Brain Res**, Sep 1 2014.

PAMPLONA, F. A. et al. Anti-inflammatory lipoxin A4 is an endogenous allosteric enhancer of CB1 cannabinoid receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 51, p. 21134-9, Dec 18 2012.

PARK, C. K. et al. Resolving TRPV1- and TNF-alpha-mediated spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain with neuroprotectin D1. **J Neurosci**, v. 31, n. 42, p. 15072-85, Oct 19 2011.

PARK, C. K. et al. Extracellular microRNAs activate nociceptor neurons to elicit pain via TLR7 and TRPA1. **Neuron**, v. 82, n. 1, p. 47-54, Apr 2 2014.

PINEAU, I.; LACROIX, S. Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved. **J Comp Neurol**, v. 500, n. 2, p. 267-85, Jan 10 2007.

POCOCK, J. M.; KETTENMANN, H. Neurotransmitter receptors on microglia. **Trends Neurosci**, v. 30, n. 10, p. 527-35, Oct 2007.

POPA, C. et al. Vascular dysfunctions following spinal cord injury. **J Med Life**, v. 3, n. 3, p. 275-85, Jul-Sep 2010.

POPOVICH, P. G.; LONGBRAKE, E. E. Can the immune system be harnessed to repair the CNS? **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 6, p. 481-93, Jun 2008.

PROFYRIS, C. et al. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. **Neurobiol Dis**, v. 15, n. 3, p. 415-36, Apr 2004.

RAGHAVENDRA, V.; TANGA, F.; DELEO, J. A. Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 306, n. 2, p. 624-30, Aug 2003.

RAMER, L. M.; RAMER, M. S.; BRADBURY, E. J. Restoring function after spinal cord injury: towards clinical translation of experimental strategies. **Lancet Neurol**, v. 13, n. 12, p. 1241-1256, Dec 2014.

REGAN, R. F.; GUO, Y. Toxic effect of hemoglobin on spinal cord neurons in culture. **J Neurotrauma**, v. 15, n. 8, p. 645-53, Aug 1998.

RINTALA, D. H. et al. Comparison of the effectiveness of amitriptyline and gabapentin on chronic neuropathic pain in persons with spinal cord injury. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 88, n. 12, p. 1547-60, Dec 2007.

RIVEST, S. Regulation of innate immune responses in the brain. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 6, p. 429-39, Jun 2009.

RIVLIN, A. S.; TATOR, C. H. Regional spinal cord blood flow in rats after severe cord trauma. **J Neurosurg**, v. 49, n. 6, p. 844-53, Dec 1978.

ROWLAND, J. W. et al. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. **Neurosurg Focus**, v. 25, n. 5, p. E2, 2008.

RYAN, A.; GODSON, C. Lipoxins: regulators of resolution. **Curr Opin Pharmacol**, v. 10, n. 2, p. 166-72, Apr 2010.

SABAT, R. et al. Biology of interleukin-10. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 21, n. 5, p. 331-44, Oct 2010.

SAKAMOTO, A. et al. Relationship between free radical production and lipid peroxidation during ischemia-reperfusion injury in the rat brain. **Brain Res**, v. 554, n. 1-2, p. 186-92, Jul 19 1991.

SCHALDACH, C. M.; RIBY, J.; BJELDANES, L. F. Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor. **Biochemistry**, v. 38, n. 23, p. 7594-600, Jun 8 1999. I

SCHANNE, F. A. et al. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. **Science**, v. 206, n. 4419, p. 700-2, Nov 9 1979.

SCHNELL, L. et al. Cytokine-induced acute inflammation in the brain and spinal cord. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 58, n. 3, p. 245-54, Mar 1999.

SCHWEIGREITER, R.; BANDTLOW, C. E. Nogo in the injured spinal cord. **J Neurotrauma**, v. 23, n. 3-4, p. 384-96, Mar-Apr 2006.

SEKHON, L. H.; FEHLINGS, M. G. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 26, n. 24 Suppl, p. S2-12, Dec 15 2001.

SERHAN, C. N. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 73, n. 3-4, p. 141-62, Sep-Oct 2005.

_____. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. **Annu Rev Immunol**, v. 25, p. 101-37, 2007.

SERHAN, C. N. et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **FASEB J**, v. 21, n. 2, p. 325-32, Feb 2007. I

SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T. E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 5, p. 349-61, May 2008.

SERHAN, C. N.; HAMBERG, M.; SAMUELSSON, B. Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in

human leukocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 81, n. 17, p. 5335-9, Sep 1984.

SERHAN, C. N. et al. Novel anti-inflammatory--pro-resolving mediators and their receptors. **Curr Top Med Chem**, v. 11, n. 6, p. 629-47, 2011.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v. 18, n. 3, p. 385-405, Sep 2004.

SIDDALL, P. J. Management of neuropathic pain following spinal cord injury: now and in the future. **Spinal Cord**, v. 47, n. 5, p. 352-9, May 2009.

SIDDALL, P. J. et al. Pregabalin in central neuropathic pain associated with spinal cord injury: a placebo-controlled trial. **Neurology**, v. 67, n. 10, p. 1792-800, Nov 28 2006.

SIDDALL, P. J.; FINNERUP, N. B. Chapter 46 Pain following spinal cord injury. **Handb Clin Neurol**, v. 81, p. 689-703, 2006.

SILVA, N. A. et al. From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury. **Prog Neurobiol**, v. 114, p. 25-57, Mar 2014.

SODIN-SEMRL, S. et al. Lipoxin A4 inhibits IL-1 beta-induced IL-6, IL-8, and matrix metalloproteinase-3 production in human synovial fibroblasts and enhances synthesis of tissue inhibitors of metalloproteinases. **J Immunol**, v. 164, n. 5, p. 2660-6, Mar 1 2000.

SROGA, J. M. et al. Rats and mice exhibit distinct inflammatory reactions after spinal cord injury. **J Comp Neurol**, v. 462, n. 2, p. 223-40, Jul 21 2003.

STYS, P. K. Anoxic and ischemic injury of myelinated axons in CNS white matter: from mechanistic concepts to therapeutics. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 18, n. 1, p. 2-25, Jan 1998.

SUN, T. et al. LipoxinA(4) induced antinociception and decreased expression of NF-kappaB and pro-inflammatory cytokines after chronic

dorsal root ganglia compression in rats. **Eur J Pain**, v. 16, n. 1, p. 18-27, Jan 2012.

SUREY, S. et al. Differential cavitation, angiogenesis and wound-healing responses in injured mouse and rat spinal cords. **Neuroscience**, v. 275, p. 62-80, Sep 5 2014.

SVENSSON, C. I. et al. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia is a critical link in inflammation-induced spinal pain processing. **J Neurochem**, v. 86, n. 6, p. 1534-44, Sep 2003.

SVENSSON, C. I.; ZATTONI, M.; SERHAN, C. N. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxin inhibit inflammatory pain processing. **J Exp Med**, v. 204, n. 2, p. 245-52, Feb 19 2007.

TAKANO, T. et al. Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 (LXA4) and LXA4 stable analogues are potent inhibitors of acute inflammation: evidence for anti-inflammatory receptors. **J Exp Med**, v. 185, n. 9, p. 1693-704, May 5 1997.

TATOR, C. H.; FEHLINGS, M. G. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. **J Neurosurg**, v. 75, n. 1, p. 15-26, Jul 1991.

TAVES, S. et al. Microglia and spinal cord synaptic plasticity in persistent pain. **Neural Plast**, v. 2013, p. 753656, 2013.

TEASELL, R. W. et al. A systematic review of pharmacologic treatments of pain after spinal cord injury. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 91, n. 5, p. 816-31, May 2010.

THURET, S.; MOON, L. D.; GAGE, F. H. Therapeutic interventions after spinal cord injury. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 8, p. 628-43, Aug 2006.

TOBOREK, M. et al. Arachidonic acid-induced oxidative injury to cultured spinal cord neurons. **J Neurochem**, v. 73, n. 2, p. 684-92, Aug 1999.

TSUDA, M. et al. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury. **Glia**, v. 45, n. 1, p. 89-95, Jan 1 2004.

TULI, S. et al. Hemodynamic parameters and timing of surgical decompression in acute cervical spinal cord injury. **J Spinal Cord Med**, v. 30, n. 5, p. 482-90, 2007.

UCEYLER, N. et al. Reduced levels of antiinflammatory cytokines in patients with chronic widespread pain. **Arthritis Rheum**, v. 54, n. 8, p. 2656-64, Aug 2006.

VANICKY, I. et al. A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat. **J Neurotrauma**, v. 18, n. 12, p. 1399-407, Dec 2001.

VAWDA, R.; FEHLINGS, M. G. Mesenchymal cells in the treatment of spinal cord injury: current & future perspectives. **Curr Stem Cell Res Ther**, v. 8, n. 1, p. 25-38, Jan 2013.

VRANKEN, J. H. Mechanisms and treatment of neuropathic pain. **Cent Nerv Syst Agents Med Chem**, v. 9, n. 1, p. 71-8, Mar 2009.

WANG, K. C. et al. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 941-4, Jun 27 2002.

WANG, Z. F. et al. Aspirin-triggered Lipoxin A4 attenuates mechanical allodynia in association with inhibiting spinal JAK2/STAT3 signaling in neuropathic pain in rats. **Neuroscience**, v. 273, p. 65-78, Jul 25 2014.

WARD, R. E. et al. Docosahexaenoic acid prevents white matter damage after spinal cord injury. **J Neurotrauma**, v. 27, n. 10, p. 1769-80, Oct 2010.

WEN, Y. R. et al. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia contributes to incision-induced mechanical allodynia. **Anesthesiology**, v. 110, n. 1, p. 155-65, Jan 2009.

WILLOUGHBY, D. A. et al. Resolution of inflammation. **Int J Immunopharmacol**, v. 22, n. 12, p. 1131-5, Dec 2000.

WOOLF, C. J. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. **Nature**, v. 306, n. 5944, p. 686-8, Dec 15-21 1983.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1765-9, Jun 9 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION.; INTERNATIONAL SPINAL CORD SOCIETY. **International perspectives on spinal cord injury**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2013. xiii, 231 pages ISBN 9789241564663 9241564660.

WU, Y.; SATKUNENDRARAJAH, K.; FEHLINGS, M. G. Riluzole improves outcome following ischemia-reperfusion injury to the spinal cord by preventing delayed paraplegia. **Neuroscience**, v. 265, p. 302-12, Apr 18 2014.

XANTHOS, D. N.; SANDKUHLER, J. Neurogenic neuroinflammation: inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity. **Nat Rev Neurosci**, v. 15, n. 1, p. 43-53, Jan 2014.

XU, J. T. et al. The role of tumor necrosis factor-alpha in the neuropathic pain induced by Lumbar 5 ventral root transection in rat. **Pain**, v. 123, n. 3, p. 306-21, Aug 2006.

XU, Z. Z. et al. Neuroprotectin/protectin D1 protects against neuropathic pain in mice after nerve trauma. **Ann Neurol**, v. 74, n. 3, p. 490-5, Sep 2013.

XU, Z. Z. et al. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. **Nat Med**, v. 16, n. 5, p. 592-7, 1p following 597, May 2010.

YAN, X.; WENG, H. R. Endogenous interleukin-1beta in neuropathic rats enhances glutamate release from the primary afferents in the spinal dorsal horn through coupling with presynaptic N-methyl-D-aspartic acid receptors. **J Biol Chem**, v. 288, n. 42, p. 30544-57, Oct 18 2013.

ZHAO, P.; WAXMAN, S. G.; HAINS, B. C. Extracellular signal-regulated kinase-regulated microglia-neuron signaling by prostaglandin

E2 contributes to pain after spinal cord injury. **J Neurosci**, v. 27, n. 9, p. 2357-68, Feb 28 2007a.

_____. Modulation of thalamic nociceptive processing after spinal cord injury through remote activation of thalamic microglia by cysteine cysteine chemokine ligand 21. **J Neurosci**, v. 27, n. 33, p. 8893-902, Aug 15 2007b.

8. ANEXOS

A.Escala de atividade locomotora BBB (Basso et al., 1995)

Movimento do Membro Posterior						Posição do Trouco		Abdome	Movimento da Pata Dianteira				Pisada		C o o r d e n a ç ã o	Liberação dos Dedos		Posição Predominante da Pata				I n s t a b i l i d a d e	T r o n c o	Cauda									
Quadril		Joelho		Tornozelo		Lado	Apoio		Balanço	Apoio da Pata		Dorsal	Plantar	Contato Inicial		Elevação																	
E	D	E	D	E	D					Sem Suporte de Peso	Com Suporte de Peso						E	D	E	D	E				D	E	D	E	D				
0	0	0	0	0	0	E	D	Arrastando	E	D	E	D	E	D	0	0	0	0	0	0*	0*	I	I	I	I	Para Cima (elevada)							
S	S	S	S	S	S	Central	E								D	E	D	E	D	E	D	O	O	O	O		O	O	E	E	E	E	Para Baixo (abaixada)
E	E	E	E	E	E																	F	F	F	F		F**	F**	P	P	P	P	
																C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C			

Rato: _____ Data / / 200 _____ Dias Pós-Operatório _____ Pontuação Esquerdo: _____ Direito: _____

Movimento	+	Pisada Dorsal > 4 passos da pata posterior	0	Nunca (0%)	I	Rotação Interna
0	Nenhum	* Liberação < 50%	O	Ocasional (< 50%)	E	Rotação Externa
S	Suaue (discreto)	** Dedos Arrastando > 4 passos da pata posterior	F	Frequente (51-94%)	P	Paralelo
E	Extenso		C	Consistente (95-100%)		

Pontuação	Definições operacionais de categorias e atributos
0	Nenhum movimento observável do membro posterior.
1	Movimento discreto (<50% da amplitude) de uma ou das duas articulações, geralmente, do quadril e/ou joelho.
2	Movimento extenso (>50% da amplitude) de uma articulação ou movimento extenso de uma articulação e discreto de uma outra.
3	Movimento extenso de duas articulações.
4	Movimento discreto de todas as três articulações do membro posterior.
5	Movimento discreto de duas articulações e extenso da terceira.
6	Movimento extenso de duas articulações e discreto da terceira.
7	Movimento extenso das três articulações do membro

	posterior.
8	Pedalada (movimento rítmico do membro posterior) sem suporte de peso <u>ou</u> apoio plantar da pata sem suporte de peso.
9	Apoio plantar da pata com suporte de peso somente em fase de apoio (i.e., quando estático) ou passada dorsal ocasional (0 – 50% do tempo), freqüente (50 – 94% do tempo) ou consistente (95 – 100% do tempo) com suporte de peso e nenhuma passada plantar.
10	Passo plantar com suporte de peso ocasional e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior.
11	Passo plantar com suporte de peso freqüente a consistente e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior.
12	Passo plantar com suporte de peso freqüente a consistente e coordenação ocasional dos membros anterior e posterior.
13	Passo plantar com suporte de peso freqüente a consistente e coordenação freqüente dos membros anterior e posterior.
14	Passo plantar com suporte de peso consistente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e posição predominante da pata rodada (interna ou externamente) durante a locomoção, no instante do contato inicial com a superfície bem como antes de liberar os dedos no final da fase de apoio <u>ou</u> passada plantar freqüente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e passada dorsal ocasional.
15	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior e nenhuma liberação dos dedos ou liberação ocasional durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata paralela ao corpo no instante do contato inicial.
16	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre freqüentemente durante o movimento do membro para a frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada no instante da liberação.
17	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos

	dedos ocorre freqüentemente durante o movimento do membro para a frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e da liberação dos dedos.
18	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para a frente, a posição é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada na liberação dos dedos.
19	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para a frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e da liberação dos dedos e apresenta a cauda para baixo parte do tempo ou por todo o tempo.
20	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para a frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e da liberação dos dedos e apresenta a cauda consistentemente elevada e instabilidade do tronco.
21	Passada plantar consistente e marcha coordenada, liberação consistente dos dedos, a posição predominante da pata é paralela ao corpo durante toda a fase de apoio, estabilidade consistente do tronco, a cauda consistentemente elevada.

DEFINIÇÕES

Discreta	Movimento parcial da articulação, inferior à metade da amplitude de movimento da articulação.
Extensa	Movimento parcial da articulação, superior à metade da amplitude de movimento da articulação.
Pedalada	Movimento rítmico do membro posterior no qual suas três articulações estão estendidas, em seguida completamente flexionadas e novamente estendidas, o animal geralmente inclina-se lateralmente, a superfície plantar da pata pode ou não tocar o solo, nenhum suporte de peso corpóreo é evidente por toda a pata posterior.
Sem suporte de peso	Nenhuma contração dos músculos extensores do membro posterior durante pisada plantar da pata ou nenhuma elevação da coxa.
Com suporte de peso	Contração dos músculos extensores do membro posterior durante a pisada plantar da pata ou nenhuma elevação da coxa.
Passada plantar	A pata está em contato plantar com suporte de peso, em seguida ocorre o movimento do membro para frente até ser restabelecido o contato plantar com suporte de peso.
Passada dorsal	O peso é suportado pela superfície dorsal da pata em qualquer ponto do ciclo do passo.
Coordenação dos membros anterior e posterior	Para todo o passo do membro anterior ocorre um passo do membro posterior e os membros posteriores se alternam.
Ocasional	Menos do que ou igual à metade das vezes, < ou igual a 50%.

Frequente	Mais do que a metade, mas não sempre, 51 – 94%.
Consistente	Quase sempre ou sempre, 95 – 100%.
Instabilidade do tronco	Lateralização do peso que causa oscilação de um lado a outro ou colapso parcial do tronco
